
DIPLOMARBEIT

Frau Dipl.-Ing.

Susann Weißbach

**Untersuchungen zu genetischen
Sequenzen und der Expression nach
Schadstoffexposition von ABC-
Transportern bei Muscheln**

Mittweida, 2010

DIPLOMARBEIT

Untersuchungen zu genetischen Sequenzen und der Expression nach Schadstoffexposition von ABC- Transportern bei Muscheln

Autor:

Frau Dipl.-Ing.

Susann Weißbach

Studiengang:

Umwelttechnik/ Biotechnologie

Seminargruppe:

UT06wB1

Erstprüfer:

Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:

Dr. Till Luckenbach

Einreichung:

Mittweida, 30.11.2010

Verteidigung/Bewertung:

Mittweida, 2011

Bibliografische Angaben:

Weißbach, Susann:

Untersuchungen zu genetischen Sequenzen und der Expression nach Schadstoffexposition von ABC-Transportern bei Muscheln –2010. – 72 S.

Mittweida, Hochschule Mittweida, University of Applied Sciences,

Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/Informatik, Diplomarbeit, 2010

Referat:

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Identifizierung von ABC-Transportern sowie genetischen Expressionsstudien in Muscheln. Das Hauptziel ist es, einerseits die erhaltenen cDNA-Sequenzen verschiedener Arten mit einander zu vergleichen und Rückschlüsse auf die Verwandtschaftsbeziehungen zu schließen. Andererseits soll die zelluläre Stressantwort bei der Exposition mit umweltrelevanten Schadstoffen charakterisiert werden.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Stellen, die aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 30.11.2010

.....

Susann Weißbach

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen herzlich bedanken, die mich beim Erstellen dieser Arbeit unterstützt haben.

Allen voran möchte ich mich besonders bei Herrn Dr. Till Luckenbach vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ) für die sehr gute Betreuung während der gesamten Diplomarbeitszeit bedanken, in der er mir mit zahlreichen Hinweisen, Ratschlägen und Hilfestellungen in der Experimentier- und Schreibphase zur Seite stand. Besonders möchte ich mich dabei für das geduldige Lesen und seine vielen hilfreichen und konstruktiven Kommentare bedanken, welche maßgeblich zum Gelingen der Diplomarbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Petra Radehaus danke ich herzlichst für die Betreuung seitens der Hochschule Mittweida und für die Übernahme des Erstgutachtens.

Mein Dank gilt außerdem allen Mitarbeitern des Departments Bioanalytische Ökotoxikologie, insbesondere Dr. Nils Klüver und Vasilij Pavlichenko, für die Unterstützung durch fachliche Hilfestellungen und dem freundschaftlichen Arbeitsklima, sowie Frau Ute Lohse vom Department Umweltmikrobiologie für die Durchführung der Sequenzierungen.

Einen besonderen Dank möchte ich ebenso an Dr. Carlos Barata und Dr. Benjamin Piña vom spanischen Institut CSIC in Barcelona für die dortige Betreuung richten. Dabei möchte ich mich vor allem bei den Mitarbeitern, insbesondere Melissa Faria und Anna Navarro, für die familiäre Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die fachliche Unterrichtung und die vielen gemeinsamen Stunden außerhalb der Arbeit bedanken.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Herrn Florian der Tauchschule Florian am Kulkwitzer See für die Beschaffung von *Dreissena polymorpha*.

Ein besonderer Dank geht außerdem an meine Mitbewohner der WG für ihre Ausdauer und Geduld.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Freunden, meiner Familie und meinen Eltern Heike und Mario, die mich all die Jahre hinweg tatkräftig unterstützt haben und meinen Plänen und Wünschen gegenüber immer offen waren.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
FORMELVERZEICHNIS.....	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
0 EINLEITUNG	1
1 ZIEL/FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	3
2 WISSENSCHAFTLICHE GRUNDLAGEN.....	5
2.1 BIVALVIA.....	5
2.1.1 MYTILUS- UND DREISSENA-ARTEN	5
2.1.2 VORKOMMEN	5
2.1.3 MORPHOLOGIE.....	6
2.2 ABC-TRANSPORTER SUPERFAMILIE	8
2.2.1 AUFBAU/STRUKTUR.....	8
2.2.2 UNTERFAMILIEN	9
2.2.2 FUNKTION	10
2.3 MDR/ MXR – SYSTEM.....	11
2.3.1 UNTERSCHIEDUNG UND VORKOMMEN	11
2.3.2 FUNKTION	12
3 MATERIAL UND METHODEN.....	14
3.1 VERWENDETE MATERIALIEN.....	14
3.1.1 GEWEBE/LARVEN-PROBEN	14
3.1.2 BAKTERIEN	14
3.1.3 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	14
3.1.4 MEDIEN FÜR BAKTERIENKULTIVIERUNGEN.....	16
3.1.6 ANTIBIOTIKA.....	16
3.1.7 ENZYME.....	16
3.1.8 KITS	16
3.1.9 LADDER-GRÖßENMARKER.....	17
3.1.10 PRIMER	17
3.2 VERWENDETE GERÄTE	17
3.3 VERWENDETE SOFTWARE.....	19
3.4 GEWINNUNG VON MUSCHELEMBRYONEN UND DEREN EXPOSITION MIT TOXISCHEN SUBSTANZEN	20
3.4.1 HERKUNFT UND HALTUNG DER VERWENDETEN MUSCHELN	20
3.4.2 GEWINNUNG DER MUSCHELEMBRYONEN	20
3.4.3 ERMITTLUNG DER TOXIZITÄT VON DACTHAL FÜR EMBRYONEN VON <i>DREISSENA</i> <i>POLYMORPHA</i>	21
3.4.4 ERMITTLUNG EINES EFFEKTS AUF DAS MXR-SYSTEM DURCH EXPOSITIONSVERSUCHE MIT <i>DREISSENA POLYMORPHA</i>	22
3.5 RNA – ISOLIERUNG MIT DER GTC-METHODE	23
3.5.1 GRUNDLAGEN	23
3.5.2 RNA-ISOLIERUNG AUS DEM GEWEBE ADULTER MUSCHELN.....	24
3.5.3 RNA-ISOLIERUNG AUS MUSCHELEMBRYONEN.....	25
3.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN.....	25

3.7 REVERSE TRANSKRIPTION (cDNA – SYNTHESE)	26
3.7.1 HINTERGRUND	26
3.7.2 SYNTHESE DER cDNA FÜR KONVENTIONELLE PCR UND RT-QPCR.....	27
3.7.3 SYNTHESE DER cDNA FÜR <i>RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS</i> (RACE) PCR	27
3.8 ERMITTLUNG DER PRIMER-SEQUENZEN FÜR PCR	28
3.9 KONVENTIONELLE POLYMERASE – KETTENREAKTION (PCR).....	29
3.9.1 ALLGEMEIN	29
3.9.2 VERWENDETE POLYMERASEANSÄTZE UND IHRE ANWENDUNG	29
3.9.3 <i>NESTED</i> PCR	31
3.9.4 GRADIENTEN-PCR	31
3.9.5 RACE-PCR.....	31
3.10 RT-QPCR	33
3.10.1 PRINZIP	33
3.10.2 ANSATZ	34
3.10.3 PRIMEREFFIZIENZ	34
3.10.4 SCHMELZPUNKTANALYSE.....	34
3.10.5 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG	35
3.10.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG	36
3.11 AGAROSEGELELEKTROPHORESE	36
3.12 DNA-EXTRAKTION.....	37
3.13 KLONIERUNG VON DNA – FRAGMENTEN	37
3.13.1 LIGATION VON PCR-PRODUKTEN	37
3.13.2 HITZESCHOCK-TRANSFORMATION DER DNA-FRAGMENTE IN <i>E. COLI</i>	39
3.13.3 BLAU/WEIß-SELEKTION + KOLONIE-PCR ZUR KONTROLLE DER INSERierten PRODUKTE	40
3.13.4 PLASMIDANREICHERUNG + EXTRAKTION	40
3.14 RESTRIKTIONSVERDAU ZUR ÜBERPRÜFUNG DER PCR-FRAGMENTE	41
3.15 SEQUENZIERUNG NACH SANGER	41
4 ERGEBNISSE.....	42
4.1. ERHALTUNG DER UNBEKANNTEN SEQUENZEN ABCB UND ABCC	42
4.1.1 AMPLIFIZIERUNG UND KLONIERUNG VON ABCB.....	42
4.1.2 AMPLIFIZIERUNG UND KLONIERUNG VON ABCC	44
4.2. DIE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE UND DIE PHYLOGENETISCHE ANALYSE VON ABC- TRANSPORTERN VERSCHIEDENER MYTILUS-ARTEN.....	45
4.2.1 ERGEBNISSDARSTELLUNG DER ERMITTELTEN SEQUENZEN.....	45
4.2.2 NACHWEIS STRUKTURELLER MERKMALE DER TRANSPORTPROTEINE AUF AMINOSÄUREEBENE	47
4.2.3 PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG DER ERMITTELTEN TRANSPORTERPROTEINE AUF NUKLEINSÄUREEBENE	51
4.3 TOXIZITÄT GETESTETER SCHÄDLICHER SUBSTRATE	53
4.3.1 ERMITTLUNG DER PROZENTUALEN ANZAHL DER FEHLENTWICKELTEN LARVEN	53
4.3.2 FISHER'S EXAKT TEST	54
4.4 UNTERSUCHUNG DER GENETISCHEN EXPRESSION AUSGEWÄHLTER ABC-TRANSPORTER AN DREISSENA POLYMORPHA	54
4.4.1 ABHÄNGIGKEITEN DER ÜBERLEBENSRATE	55
4.4.2 BESTIMMUNG DER PRIMEREFFIZIENZ UND SCHMELZPUNKTANALYSE	56

4.4.3 BESTIMMUNG DER RELATIVEN EXPRESSION VON ABCB UND ABCC	58
4.4.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERMITTELTEN RELATIVEN EXPRESSION FÜR ABCB UND ABCC	60
5 DISKUSSION.....	64
5.1 STRUKTURELLE ANALYSE DER ABCB- UND ABCC- HOMOLOGE.....	65
5.2 VERWANDTSCHAFTS-BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN VERSCHIEDENEN MYTILUS-ARTEN	65
5.3 BESTIMMUNG DER PRIMEREFFIZIENZ UND DIE SCHMELZPUNKTANALYSE	66
5.4 LARVEN VON <i>DREISSENA POLYMORPHA</i> ALS TESTORGANISMUS	67
5.5 TOXIZITÄT DES GETESTETEN TOXISCHEN SUBSTRATES DACTHAL.....	68
5.6 INDUKTION VON ABCB UND ABCC DURCH TOXISCHE SUBSTANZEN	68
6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	71
LITERATURVERZEICHNIS.....	X
ANLAGE 1	XV
ANHANG 2.....	XXI
ANHANG 3.....	XXII
ANHANG 4.....	XXX
ANHANG 5.....	XXXIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die regionale Verteilung ausgewählter Muschelarten	6
Abbildung 2: Morphologie einer <i>Bivalvia</i> (Benton, 2009)	6
Abbildung 3: Lebenszyklus der <i>Dreissena polymorpha</i> (Wildlife, 2010).....	7
Abbildung 4: Sekundär Struktur von ABC-Transportern (Kuo, 2007)	10
Abbildung 5: Substrat-Ausschluss durch einen ABC-Transporter (Aller, 2009)	11
Abbildung 6: MXR/MDR-System (Bard, 2000)	13
Abbildung 7: Haltung der <i>Dreissena polymorpha</i> unter Laborbedingungen	20
Abbildung 8: Darstellung der P-gp Expression in verschiedenen Larvenstadien (Faria, 2010).....	23
Abbildung 9: Durchführung der RACE mit zwei Primerpaaren (Clontech Laboratories, 2010)	31
Abbildung 10: pCR 2.1 Vektor (Invitrogen, 2004)	38
Abbildung 11: pCR II-Blunt-Topo Vektor (Invitrogen, 2006)	39
Abbildung 12: Darstellung PCR-Produkte durch ein Gel von ABCB in <i>M. edulis</i>	42
Abbildung 13: erste RACE-PCR mit <i>M. edulis</i>	43
Abbildung 14: nested RACE-PCR mit <i>M. edulis</i>	43
Abbildung 15: Amplifizierung des gesamten ORF von ABCB von <i>M. edulis</i> und <i>M. trossulus</i>	43
Abbildung 16: Darstellung von PCR-Produkte durch ein Gel von ABCC in <i>M. trossulus</i>	44
Abbildung 17: Bande nach nested RACE-PCR ABCC von <i>M. trossulus</i> mit dem Primerpaar 28 & 29	44
Abbildung 18: Darstellung der ermittelten Sequenzen in Sequencher	46
Abbildung 19: Darstellung des „Contig“ von <i>M. edulis</i> ABCB	46
Abbildung 20: Punktmutation.....	47
Abbildung 21: Aminosäuresequenz von <i>D. polymorpha</i> ABCB	48
Abbildung 22: Aminosäuresequenz von <i>D. polymorpha</i> ABCC.....	48
Abbildung 23: Vergleich von ABCB verschiedener <i>Mytilus</i> -Arten	49
Abbildung 24: Vergleich von ABCC verschiedener <i>Mytilus</i> -Arten.....	50
Abbildung 25: Phylogenetische a) Tabelle mit den prozentualen Identitäten zwischen den <i>Mytilus</i> -Arten und anderen hinzugezogenen Organismen. Der phylogenetische b) Stamm-Baum mit Bootstrap Wert zwischen den verschiedenen Arten.	52
Abbildung 26: Beispiel a) einer fehlentwickelten Larve	53
Abbildung 27: Beispiel b) einer fehlentwickelten Larve	53
Abbildung 28: Überlebensrate verschiedener Larven für unt. Population.....	56
Abbildung 29: Abhängigkeit der Überlebensrate von Behandlungen.....	56
Abbildung 30: Schmelzpunktkurve von MRP	57
Abbildung 31: Schmelzpunktkurve von Pgp	57
Abbildung 32: Schmelzpunktkurve von S3.....	57
Abbildung 33: Standardkurve für P-gp.....	57
Abbildung 34: Standardkurve für MRP	57
Abbildung 35: Standardkurve für S3	58
Abbildung 36: Expression des Referenzgen S3	58
Abbildung 37: Abhängigkeit der relativen Expression von PGP und MRP von unterschiedlichen Behandlungen	59
Abbildung 38: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests.....	60
Abbildung 39: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests von Variante 1..	61
Abbildung 40: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests von Variante 2..	61
Abbildung 41: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests von Variante 3..	62

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chemikalienliste	14
Tabelle 2: selbsthergestellte Lösungen.....	15
Tabelle 3: geordnete Lösungen	15
Tabelle 4: benötigte Reagenzien für die Bakterienkultivierung.....	16
Tabelle 5: verwendete Antibiotika.....	16
Tabelle 6: verwendete Enzyme	16
Tabelle 7: verwendete Kits.....	16
Tabelle 8: verwendete Geräte	17
Tabelle 9: Zusammensetzung der verschiedenen Behandlungen für den Toxizitätstest	21
Tabelle 10: Zusammensetzung der verschiedenen Behandlungen für die Expositionsversuche	22
Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	27
Tabelle 12: Temperatur-Zeitverlauf der cDNA -	27
Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	28
Tabelle 14: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	28
Tabelle 15: Temperatur– Zeitverlauf für die cDNA–Synthese	28
Tabelle 16: Reaktionsansatz für Taq-Polymerase	30
Tabelle 17: Reaktionsansatz für Phusion-Polymerase	30
Tabelle 18: Temperatur- Zeit-Verlauf für Taq-Polymerase	31
Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Verlauf für Phusion-	31
Tabelle 20: Reaktionsansatz für RACE	32
Tabelle 21: touchdown Programm	32
Tabelle 22: Reaktionsansatz für <i>nested</i> RACE	33
Tabelle 23: Temperatur-Zeit-Verlauf für nested RACE	33
Tabelle 24: Reaktionsansatz für RT-qPCR	34
Tabelle 25: Reaktionsansatz für die Ligation mit pCR 2.1.....	38
Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Ligation mit pCR II-Blunt-Topo.....	39
Tabelle 27: Reaktionsansatz für die Ligation mit pJET 1.2	39
Tabelle 28: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR	40
Tabelle 29: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau von Blunt-TOPO-Vektor pJET 1.2-Vektor.....	41
Tabelle 30: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau von pCR 2.1- und pCR II.....	41
Tabelle 31: Reaktionsansatz für Sequenzierung	41
Tabelle 32: Temperatur-Zeit-Verlauf für Sequenzierung	41
Tabelle 33: Test der toxischen Wirkung von Dacthal auf die Larven der <i>Dreissena polymorpha</i>	53
Tabelle 34: Auswertung des Toxizitätstestes mit Hilfe des Fisher's Exakt Tests	54
Tabelle 35: Expositionsversuch vom 09.07.2010.....	55
Tabelle 36: Expositionsversuch vom 20.07.2010.....	55
Tabelle 37: Expositionsversuch vom 06.08.2010.....	55
Tabelle 38: Vergleich der relativen Expression von PGP zwischen den verschiedenen Behandlungen	59
Tabelle 39: Vergleich der relativen Expression von MRP zwischen den verschiedenen Behandlungen	59
Tabelle 40: Zugangsnummern für die NCBI-Datenbank	XXI
Tabelle 41: vektorspezifische und genspezifische Primer	XXXIII
Tabelle 42: full lentgh Primer.....	XXXIII
Tabelle 43: RACE-Primer	XXXIII

Formelverzeichnis

Formel 1: Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	26
Formel 2: Berechnung der eingesetzten Menge an benötigter RNA für die cDNA-Synthese	27
Formel 3: Berechnung der Primereffizienz aus dem Anstieg der Standardkurve.....	34
Formel 4: Berechnung der Anzahl der Transkripte in der Probe	35
Formel 5: Normalisierung der Expression des Zielgens durch ein Referenzgen.....	35
Formel 6: vereinfachte Berechnung der relativen Expression und Kopiezahl des Zielgens	36
Formel 7: Relative Expression zweier Proben zueinander.....	36
Formel 8: Berechnung der benötigten Menge an frischem PCR-Produkt	38

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
ADP	Adenosindiphosphat
ABC-Transporter	<i>ATP-binding cassette transporter</i>
AS	Aminosäure
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
bp	Basenpaar
BCRP	<i>breast cancer resistance protein</i>
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C_T	<i>cycle threshold</i>
Dac	Dacthal
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
G	Guanin
GSP	Genspezifischer Primer
GTC-Methode	Guanidine-thiocyanate-Methode
MDR	<i>multidrug resistance</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRP	<i>multidrug resistance associated protein</i>
MXR	<i>multixenobiotic resistance</i>
NBD	Nukleotidbindungsdomäne
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P-gp	<i>permeability glykoprotein</i>
RACE	<i>rapid amplification of cDNA ends</i>
RNA	Ribonukleinsäure

RNAse	Ribonuklease
RT-qPCR	<i>reverse transkriptase quantitative PCR</i>
SOB	<i>super optimal broth</i>
T	Thymin
TMD	Transmembrandomäne
UPM	<i>universal primer mix</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV-Licht	Ultraviolettes Licht

0 EINLEITUNG

Vor mehr als 30 Jahren wurde erkannt, dass eine Resistenz von Tumorzellen gegen eine Vielzahl von zytotoxischen Arzneistoffen eine erfolgreiche Chemotherapie gegen Krebs limitiert. In genaueren Analysen von Tumorzellen mit gleichen Resistenzen wurde das membran-integrierte *P-glykoprotein 1* (P-gp) als eines der wichtigsten Verursacher für diese sogenannte *multidrug resistance* (MDR) charakterisiert (Germann, 1998). Das *P-glykoprotein 1* gehört zu der Unterfamilie ABCB der Adenosintriphosphat (ATP)-abhängigen ABC (ATP binding Cassette)-Transporterproteine, welche in allen Prokaryonten und Eukaryonten vorliegen und eine Vielzahl an Substanzen über Zellgrenzen hinweg gegen den Konzentrationsgradienten transportieren. Neben P-gp zählen die beiden ABC-Transporter *multidrug resistance associated protein 1* (MRP1/ ABCC1) und *breast cancer resistance protein* (BCRP/ ABCG2) zu den wichtigsten Efflux-Proteinen des MDR-Schutzsystems. Sie können toxische Fremdkörper nicht nur aus der Zelle heraus transportieren, sondern diese schon am Eindringen in die Zelle hindern (Leslie, 2005; Epel, 2008). Dieses bedeutende Prinzip vom Schutz der Zellen vor potentiell toxischen Xenobiotika durch die membran-integrierten ABC-Transporter wurde nicht nur in Krebszellen, sondern in anderen menschlichen Geweben identifiziert. Außerdem wurde P-gp und MRP erstmals durch Kurelec (1992) in mehreren aquatischen Organismen, wie der Muschel, Schwamm, Wurm und Fisch, nachgewiesen und als *multixenobiotic resistance* (MXR) bezeichnet (Kurelec, 1992; Smital, 1998). Die verschiedenen Spezies und deren Organe weisen einen unterschiedlichen Grad an MXR-Transporteraktivität auf (Smital, 2000). Für die wasserfiltrierenden Muscheln ist diese Art von Schutz von besonderer Wichtigkeit, da sie kontinuierlich den in Wasser gelösten natürlichen und anthropogenen Schadstoffen ausgesetzt sind (Epel, 1998; Bard, 2000). Daher liegt in den Kiemen eine erhöhte Expression von Efflux-Transportern vor, die als „Umwelt-Gewebe-Schranke“ einen strukturellen Mechanismus als erste Verteidigungslinie für den zellulären Schutz vor Schadstoffen bilden (Luckenbach, 2008; Luedeking, 2004).

Der Fokus der Untersuchungen dieses zellulären Schutzsystems ist vorwiegend auf die medizinische Bedeutung gerichtet. Neue Kenntnisse aus der Forschung hinsichtlich der Umweltrelevanz der ABC-Transporter im MXR-System in Wildorganismen könnten auch in Biomonitoringuntersuchungen eingesetzt werden, da die Expression dieser Transporter durch Xenobiotika ansteigt (Bard, 2000; Feldstein, 2006). In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung der Gensequenzen von MRP und P-gp in weitverbreiteten Muschelarten, wie *Mytilus galloprovincialis* und *Dreissena polymorpha*, von Interesse, die dann in Studien zur Expression nach Schadstoffexposition verwendet werden können. Weiterhin können die Sequenzdaten für phylogenetische Vergleiche eingesetzt werden, um z.B. zu ermitteln, ob

Unterschiede in Sequenzabschnitten bei verschiedenen Arten eine Folge unterschiedlicher Anpassungen an Umweltfaktoren sind.

Im Nachfolgenden werden die Ziele dieser Arbeit erläutert. Anschließend werden Lebensweise, Reproduktion und geografische Verbreitung von Muscheln, die in dieser Arbeit untersucht wurden, vorgestellt. Weiterhin wird die Struktur und Funktionsweise von ABC-Transportern im Zusammenhang mit dem MDR/MXR-System erklärt, wobei der Fokus auf den ABC-Transportern P-gp und MRP liegt.

1 ZIEL/FRAGESTELLUNG DER ARBEIT

Die in die Biomembran integrierte Superfamilie der ABC-Transportproteine bildet die erste Schutzlinie gegen die Exposition von möglichen toxischen Substanzen und deren Akkumulation im Organismus und spielt eine wichtige Rolle in Muscheln, welche durch ihre hohe Filterleistung kontinuierlich den in Wasser gelösten Stoffen exponiert sind. Bedeutende ABC-Transporter sind dabei P-gp und MRP aus den ABCB- und ABCC-Unterfamilien der ABC-Transporter. Es liegen bekannte Sequenzen dieser ABC-Transportproteine für die Gattung *Mytilus* der Arten *M. galloprovincialis*, *M. californianus* und *M. edulis* vor. Die verschiedenen Muschelarten kommen in unterschiedlichen Meeresregionen vor, wobei *M. galloprovincialis* relativ weit verbreitet und im Gegensatz zu den beiden anderen Arten invasiv ist, d.h. durch Verbreitung durch den Menschen (Ballastwasser in Schiffen) sich in Gegenden ausbreitet, wo sie vorher nicht vorkam. Die Frage, ob sich die Transporter P-gp und MRP von *M. galloprovincialis* von den anderen Arten unterscheiden und damit auf eine höhere Resistenz gegen Chemikalien in der Umwelt geschlossen werden kann, wurde in der vorangegangenen Diplomarbeit „Molekularbiologische Untersuchungen an ABC-Transportern verschiedener Organismen“ von Mirko Pietsch am UFZ untersucht. Jedoch entstand durch eine sehr hohe Ähnlichkeit von P-gp von *M. edulis* und *M. californianus* der Verdacht, dass beide Sequenzen in der Tat identisch sind und dass die vermeintliche *M. edulis*-Sequenz von *M. californianus* stammt. Grund hierfür wäre eine Kontamination von Reagenzien und/oder *M. edulis*-RNA/cDNA mit Plasmid mit der *M. californianus*-Sequenz bei der Aufklärung der *M. edulis* –Sequenz. Daher war es in dieser Arbeit von Interesse, die cDNA-Sequenz von P-gp von *M. edulis* zu verifizieren bzw. zu korrigieren. Darüberhinaus sollten P-gp und MRP einer weiteren *Mytilus*-Art, *M. trossulus*, identifiziert werden. Wie *M. edulis* und *M. californianus* ist *M. trossulus* keine invasive Art. Es sollte ermittelt werden, inwieweit sich P-gp- und MRP-Sequenzen der vier *Mytilus*-Arten unterscheiden, und ob die Unterschiede auf die verwandtschaftliche Distanz der vier Arten oder auf mehr oder weniger ausgeprägte Anpassungen an chemischen Stress zurückzuführen sind. Für *M. galloprovincialis* wird demnach eine höhere Stresstoleranz angenommen, die es der Art ermöglicht, neue, auch stark kontaminierte Lebensräume zu besiedeln. Daher sollte die Frage geklärt werden, ob sich dies in den Sequenzen der ABC-Transporter widerspiegelt. So wäre denkbar, dass die Transporter von *M. galloprovincialis* effektiver als „Pumpen“ von Schadstoffen arbeiten und daher diese Art höhere Schadstoffkonzentrationen in der Umwelt tolerieren kann.

Wie *M. galloprovincialis* ist auch die Zebra- und Muschel *Dreissena polymorpha* eine invasive Muschelart. Ziel, war es die Sequenzen von MRP und P-gp zu identifizieren, und diese dann für genetische Expressionsstudien unter Anwendung der RT-qPCR zu verwenden, um einen

Einblick auf den Einfluss von Chemikalien auf die Expression von ABC-Transportern zu erhalten.

Für diese Studien eignet sich *Dreissena polymorpha* gut als Modellorganismus für aquatische Organismen, da die Haltung in Süßwasseraquarien relativ geringen Aufwand erfordert und Embryonen und Larven im Labor gewonnen und gehalten werden können. Daher ist es von Interesse, mit Larven von *Dreissena polymorpha* Untersuchungen der Expression von MRP und P-gp bei der Induktion mit chemischen Substanzen durchzuführen. Als Testsubstanzen für die Induktionsversuche dienten Dacthal als Modell einer organischen Umweltchemikalie und anorganisches Quecksilber, ein umweltrelevantes Schwermetall. Außerdem wurden durch die Stoffe hervorgerufene toxische Effekte ermittelt.

Für diese Analysen wurde zunächst die vollständige cDNA-Sequenz von MRP und P-gp aus dem Mitteldarmdrüsengewebe der adulten *M. trossulus*, *M. edulis* und *Dreissena polymorpha* mit Hilfe der RT-PCR (Reverse Transkriptase - polymerase chain reaction), Klonierung und Sequenzierung gewonnen. Dazu wurden bereits bekannte cDNA-Sequenzen von *M. galloprovincialis* und *M. californianus* als Matrize für die Primererstellung verwendet. Die erhaltenen Sequenzen wurden in einer entsprechenden Software zusammengesetzt und analysiert. Dabei wurde festgestellt, inwiefern sich die Sequenzen der ABC-Transporter der verschiedenen Gattungen bzw. innerhalb einer Gattung und mit weniger verwandten Organismen auf Nukleinsäureebene ähneln und daraus Rückschlüsse auf die regionale Verbreitung und deren Stresstoleranz gezogen. Dabei wurde untersucht, ob die ermittelte cDNA-Sequenz von ABCB der *M. edulis* erneut eine starke Ähnlichkeit mit der von *M. californianus* aufweist.

Aus der erhaltenen Gensequenz für MRP und P-gp von *Dreissena polymorpha* wurden Primer für die RT-qPCR erstellt, um Aussagen über deren Expression treffen zu können. Dazu wurden Larven von *Dreissena polymorpha* gegen unterschiedliche Konzentrationen der zu untersuchenden Stoffe Dacthal und anorganisches Quecksilber exponiert, anschließend die RNA isoliert und mit der daraus synthetisierten cDNA die RT-qPCR durchgeführt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden gegen das ribosomale Protein S3 normalisiert und statistisch ausgewertet, um eine Aussage über die Stressantwort treffen zu können.

2 WISSENSCHAFTLICHE GRUNDLAGEN

2.1 BIVALVIA

Die *Bivalvia* sind eine große taxonomische Klasse und umfassen die bilateral symmetrisch paarigen Schalentiere (Storch, 2009), welche zum Stamm der *Mollusca* (Weichtiere) gehören (Clauss, 2005). Die rund 30.000 Spezies weltweit bevölkern eine große Bandbreite an verschiedenen aquatischen Lebensräumen, wie Salzwasser, Brackwasser und Süßwasser. Die Muscheln werden nach verschiedenen Kriterien klassifiziert, wie Schalenform, -aufbau, Kiemenstruktur, Dentition, Musterung und Größe (Benton, 2009).

2.1.1 MYTILUS- UND DREISSENA-ARTEN

Eine der artenreichsten Gattungen neben der Auster und der Kammmuschel stellt die Miesmuschel (*Mytilus*) dar. Sie ist eine weltweit verbreitete Salzwassermuschel und besitzt eine schwarz-blaue Färbung. Die bekanntesten Arten sind *M. edulis*, *M. californianus*, *M. trossulus* und *M. galloprovincialis*, welche je nach Salzkonzentration, Temperatur und Lebensraumbeschaffung unterschiedliche Regionen der Meere besiedeln (Riginos, 2005) und somit auch in ihrer morphologischen Beschaffenheit variieren (Innes, 1999).

Die 3-5 cm große *Dreissena polymorpha* ist eine weitverbreitete, invasionsartig auftretende Süßwassermuschel. Sie wird durch ihre Musterung und Form auch als Zebromuschel oder Dreiecksmuschel bezeichnet. Sie besitzt stark auffallende dunkle und helle Zick-Zack-Banden. Durch die Variationen in der Farbe und der Musterung erhielt sie den Artnamen *polymorpha*. Sie bevölkert vorwiegend Seen, Flüsse und Brackwasserlagunen (Birnbaum, 2006).

2.1.2 VORKOMMEN

Dreissena polymorpha besiedelt die Flüsse und Seen in Europa und gelangte durch das Brackwasser in den Schiffen in die *Great Lakes* von Nordamerika. Außerdem ist sie auch in den Gewässern Ostasiens vorhanden (Abb. 1).

Die *Mytilus*-Arten unterscheiden sich in ihrer Verbreitung. *Mytilus galloprovincialis* ist vor allem im Mittelmeerraum, sowie an der Küste Südafrikas, im Westatlantik und Ostpazifik zu finden. *Mytilus californianus* ist ebenfalls in südlicheren Breitengraden an der Westküste Amerikas beheimatet. *M. edulis* und *M. trossulus* hingegen sind in nördlicheren Gegenden anzutreffen (Abb. 1) (Gérard, 2008; Baur-Kruppas, 2010; Rey, 2010).

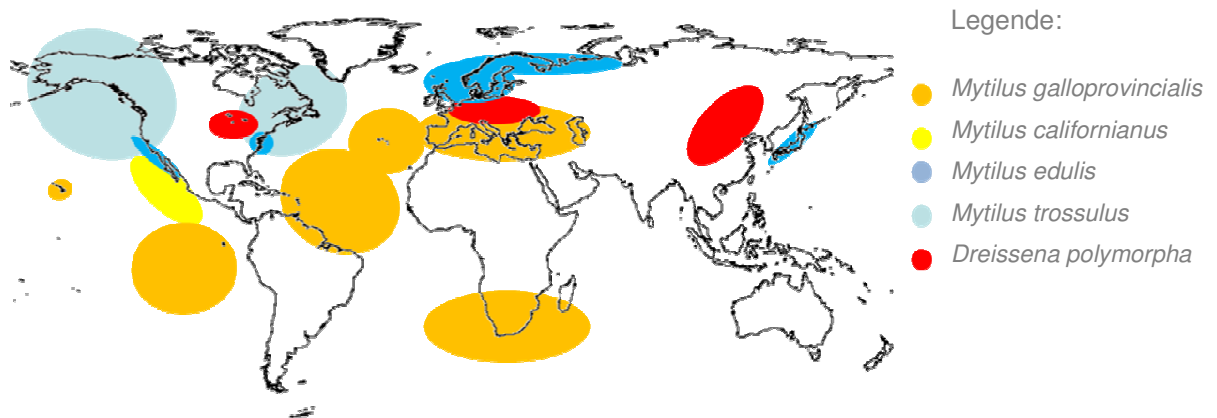


Abbildung 1: Übersicht über die regionale Verteilung ausgewählter Muschelarten

Die verschiedenen *Mytilus*-Arten und *Dreissena polymorpha* unterscheiden sich in ihrem Vorkommen, welches durch die unterschiedlichen Farben dargestellt ist. Dies ist aus der Legende zu entnehmen.

2.1.3 MORPHOLOGIE

Der Körper von Muscheln setzt sich aus einem rückgebildetem Kopf, einem Eingeweidesack und einem ventralen muskulösen Fuß zusammen. Die Haut ist reich an Drüsenzellen, welche eine Kalziumkarbonatschicht, die Schale, bilden. Die Schalen stellen virtuelle Spiegelbilder des jeweils anderen dar und sind durch einen Schließmuskel, ein elastisches Ligament sowie ein Schloss miteinander verbunden. Die Muscheln sind fast immer sesshaft und leben am Gewässergrund, nur wenige Arten können sich durch schnelles Auf- und Zuklappen der Schalen fortbewegen. Mit Hilfe von seidenartigen Byssus-Fäden können sie sich an Oberflächen anhaften. Die sensorischen Organe, wie Chemorezeptoren und *eye-spots*, sind in der Mantelgegend konzentriert. Rechts und links befinden sich zwischen dem Fuss und dem Mantellappen je eine Kieme, welche der Atmung und der Nahrungsgewinnung durch Filterung des einströmenden Wasser dient. Die meisten Muscheln sind getrenntgeschlechtlich. Die Eier oder Spermien werden in den Gonaden gebildet und über die Kiemengänge und Egestionsöffnungen in das Wasser entleert (Abb. 2) (Storch, 2009; Clauss, 2005; Benton, 2009).

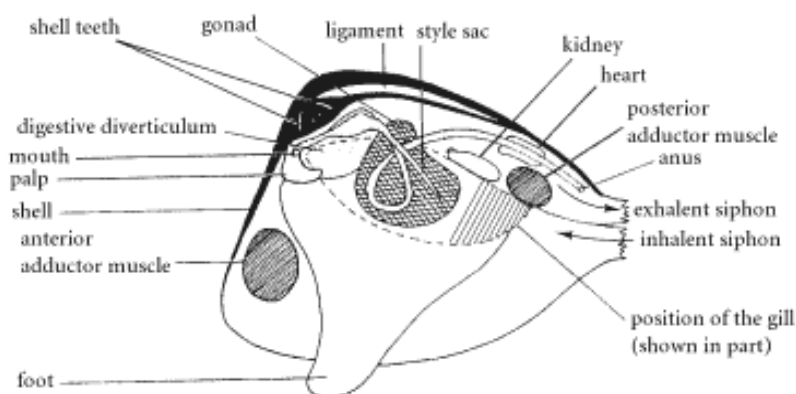


Abbildung 2: Morphologie einer Bivalvia (Benton, 2009)

Der Aufbau von Muscheln setzt sich aus zwei symmetrischen Kalzium-karbonathaltigen Schalen zusammen, welche die hier im Bild dargestellten Organe umfassen.

2.1.4 REPRODUKTION UND LEBENSZYKLUS DER *DREISSENA POLYMORPHA*

Dreissena polymorpha ist ab einem Alter von einem Jahr geschlechtsreif. Die Laichzeit beginnt, in Abhängigkeit von Temperatur und Planktonverfügbarkeit, im Mai bis Juli eines Jahres. Eine weibliche Muschel kann dabei im Durchschnitt 30.000 – 40.000 Eier pro Saison produzieren. Die Eier werden in das freie Wasser abgesondert und von den umliegenden Männchen wahrgenommen, welche daraufhin ihr Sperma ausscheiden. Einige Stunden nach der Fertilisation bekommen die Embryonen einen Kranz aus haarähnlichen Filamenten, die sogenannten Zilien, und werden als Larven oder Veliger bezeichnet. Diese Phase ist ein metamorphoses Übergangsstadium zu den ausgewachsenen Muscheln. Durch die Zilien können sie sich frei im Wasser bewegen und mit Plankton versorgen. Wenn sie eine Größe von rund 200 µm erreicht haben, sind sie zu groß, um weiterhin im Wasser zu flotieren. In diesem Post-Veliger-Stadium sinken sie auf den Boden und versuchen einen geeigneten Untergrund zu finden, wo sie sich mit Hilfe der Bysussfäden anheften können. In den nächsten drei Wochen verwandeln sich die Larven in die juvenile Form der Muschel. Diese wandert oft noch so lange am Meeresboden bis sie einen geeigneten Standort mit ausreichend Nahrungsvorkommen gefunden hat. In dem ersten Jahr wachsen sie bis zu einer Größe von 2,5 cm zu einer ausgewachsenen Muschel heran (Abb. 3). (Birnbaum, 2006; Projekt, 2010; Wildlife, 2010)

In einer Studie über die *Dreissena polymorpha* wurde festgestellt, dass die ABCB – Expression einen Tag nach der Befruchtung im *early life stage*-Stadium am höchsten ist und danach wieder absinkt (Faria, 2010).

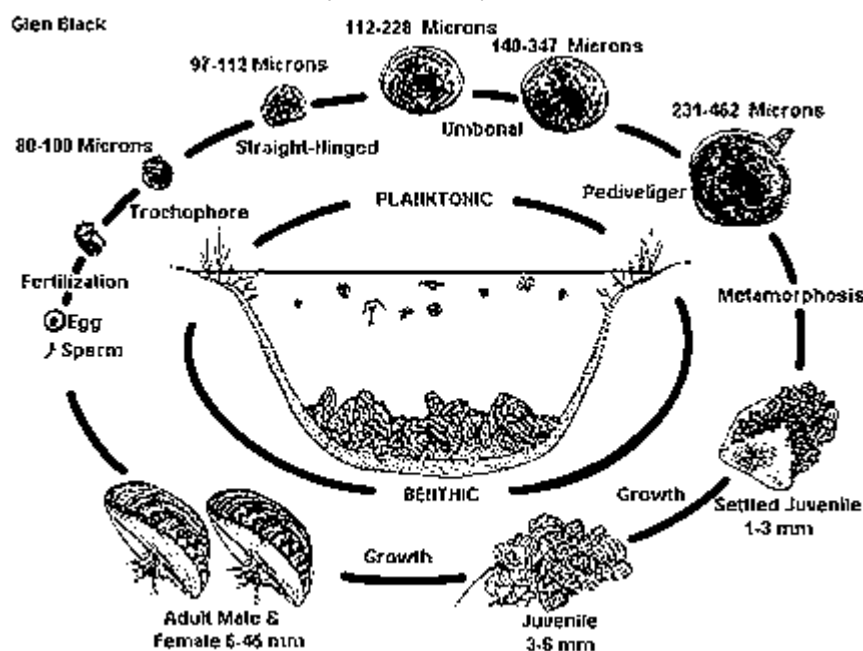


Abbildung 3: Lebenszyklus der *Dreissena polymorpha* (Wildlife, 2010)

Die *Bivalvia* durchläuft als Larve ein Metamorphismus-Stadium vom fertilisierten Ei bis hin zu ihrer adulten Form. Dabei kann sie sich mit Hilfe von Zilien fortbewegen und einen geeigneten Standort mit hohem Nahrungs-Angebot aufsuchen.

2.2 ABC–TRANSPORTER SUPERFAMILIE

ABC-Transporter (=ATP-*binding cassette*) stellen eine energieabhängige, (Germann, 1998) komplexe Proteingruppe dar, welche eine hochkonservierte homologe ATP-Bindungsdomäne besitzt (Karp, 2005) und in exportierende (Efflux) und importierende Transporter unterschieden wird (Locher, 2009).

Die Mitglieder der ABC-Transporter kommen in allen Organismen von Archaeobakterien, Bakterien, Hefen, Pflanzen bis hin zu Insekten, Tieren und Menschen vor. Sie besitzen eine zentrale Rolle im Transport von verschiedensten schwach hydrophoben Substraten, wie Ionen, Zucker, Aminosäuren, Vitaminen, Lipiden und Antibiotika (Epel, 1998; Biemans-Oldehinkel, 2006) durch intrazelluläre Plasmamembranen. Diese Transportbewegungen erfolgen unter der Nutzung von Energie aus der Hydrolyse von intrazellulärem ATP (Ambudkar, 2005), wobei intrazelluläres ADP und anorganisches Phosphat entsteht (Sarkadi, 2006). Sie sind bedeutend für die Beförderung von Nährstoffen, den Transport von Ionen und Peptiden, den Ausstoß von Schadstoffen sowie der Verbreitung von Zellsignalen (Germann, 1998).

2.2.1 AUFBAU/STRUKTUR

Die Proteine bestehen im Wesentlichen aus einer hoch homologen zweiteiligen Struktur aus vier Kernregionen, welche zwei hydrophobe, membran-integrierte Transmembrandomänen (TMD) und zwei nachfolgende hydrophile Nukleotidbindungsdomänen (NBD) besitzen. (Endicott, 1989) Diese NH₂-TMD₁-NBD₁-TMD₂-NBD₂-COOH-Struktur bestimmt die Regulation und Funktion der Transporter (Biemans-Oldehinkel, 2006).

Dabei wird in *full transporter* und *half transporter* unterschieden. Die Struktur TMD₁-NBD₁-TMD₂-NBD₂ eines *full transporter* wird in einem einzigen Gen kodiert, wie bei ABCB1 und ABCC1. Bei einem *half-transporter* werden TMD₁-NBD₁ und TMD₂-NBD₂ einzeln kodiert und über eine Homo-/Heterodimerisation miteinander verbunden, um funktionsfähig zu sein, beispielsweise ABCG2 (Szakács, 2009).

Die TMD ist ein Set aus mehreren, meist sechs membran-überspannenden Segmenten (TM) (Schneider, 2000), welche über extra- und intrazelluläre *loops* in Verbindung stehen und eine tunnelähnliche Pore bilden, um den Stoff aus der Zelle zu schleusen (Germann, 1998). Diese Domäne bestimmt die Substratspezifität und unterscheidet sich daher stark innerhalb der verschiedenen Transporterfamilien jedoch nicht innerhalb eines Transporters (Higgins, 1992).

Die NBD ist rund 200 Aminosäuren lang und liegt auf der zytoplasmatischen Seite im Gegensatz zu TMD hoch konserviert mit einer Sequenzidentität von 30-50% zwischen den verschiedenen Unterfamilien vor (Higgins, 1992), was bedeutet, dass die Membranproteine wahrscheinlich dieselben Mechanismen nutzen, um den Transport zu aktivieren. Außerdem besitzt sie mehrere charakteristische Merkmale, wie *Walker A*, *Walker B*, *ABC-signature* und die D-, H-, Q-, A- *loops* (Germann, 1998). Die NBD ist verantwortlich für die Bindung und Hydrolyse von intrazellulärem ATP, um durch die gewonnene Energie den Transportprozess zu gewährleisten. Dabei entsteht ein Nukleotid-Sandwich-Dimer (Locher, 2009), da das ATP an *Walker A/B* und den A-loop von NBD₁ und an den D-loop von NBD₂ bindet. Diese verschiedenen Merkmale zwischen der NBD und TMD spielen dabei eine wichtige Rolle in der ATP-Bindung, -Hydrolyse und der Kommunikation zwischen der NBD und der TMD. (Ambudkar, 2005; Deeley, 2006)

2.2.2 UNTERFAMILIEN

Beim Mensch wurden 49 (Deeley, 2006) ABC-Transporter nachgewiesen, welche nach phylogenetischen Analysen in sieben Unterfamilien von ABCA bis ABCG eingeteilt wurden. Die bedeutendsten Unterfamilien der ABC-Transporter, welche eine multispezifische Arzneiresistenz aufweisen, sind die Exporttransporter *P-glykoprotein* (ABCB1; MDR1; P-gp; ABCB-Unterfamilie), das *multidrug resistance associated protein* der ABCC-Unterfamilie (ABCC1; MRP1) und das *breast cancer resistance protein* der ABCG-Unterfamilie (ABCG2; MXR; BCRP). (Szakács, 2009)

P-glykoprotein (P-gp)

Juliano und Ling entdeckten erstmals bei Untersuchungen von Tumorresistenzen das 170 kDA schwere transmembrane Transportprotein *permeability* Glykoprotein (P-gp), welches auch häufig als *multidrug resistance protein 1* bezeichnet wird (Germann, 1998). Es ist ein fundamentales Transportprotein, welches hoch konserviert im Laufe der Evolution von den Bakterien zum Mensch gelangte und somit in allen Organismen vorhanden ist (Endicott, 1989). Es transportiert eine Vielzahl von strukturell und funktionell verschiedenen Substraten aus der Zelle (Export), welche jedoch alle hydrophob, klein, neutral oder positiv geladen sind. Der *full transporter* ist ca. 1280 Aminosäuren lang, besitzt eine *linker region* (Sarkadi, 2006) und besteht aus zwei Hälften, welche je eine TMD und eine NBD besitzt (Abb. 4). Nach der Transkription erfolgt eine posttranslationale Modifikation sowie die Glykosylierung und Phosphorylierung (Bard, 2000).

Multidrugresistance associated protein (MRP1)

MRP1 wurde 1992 in einer menschlichen Lungen-Zelllinie H69AR entdeckt und weist eine Resistenz gegenüber natürlichen Arzneistoffen und ihren durch Biotransformationsprozessen

entstehenden Metaboliten auf (Deeley, 2006). Es besitzt im Gegensatz zu P-gp eine zusätzliche NH₂-terminale TMD mit 5 TMs, wobei sich der NH₂-Terminus extrazellulär befindet (Abb. 4). Außerdem besteht zwischen den beiden NBDs eine geringere Symmetrie als bei P-gp. Es kann neben neutralen, hydrophoben Komponenten auch verschiedene organische Anionen transportieren. MRP1 weist in allen Organgeweben eine Grundexpression auf. Jedoch sind hohe Expressionslevel in Lunge, Hoden, Niere, Plazenta, Skelett- und Herzmuskeln bekannt (Flens, 1996; Cole, 1992).

BCRP hingegen transportiert hydrophobe, positiv geladene Moleküle (Abb. 4). Durch die Überlappung der Substratspezifität entsteht ein Netzwerk aus einer multiplen Resistenz. (Szakács, 2009; Sarkadi, 2006)

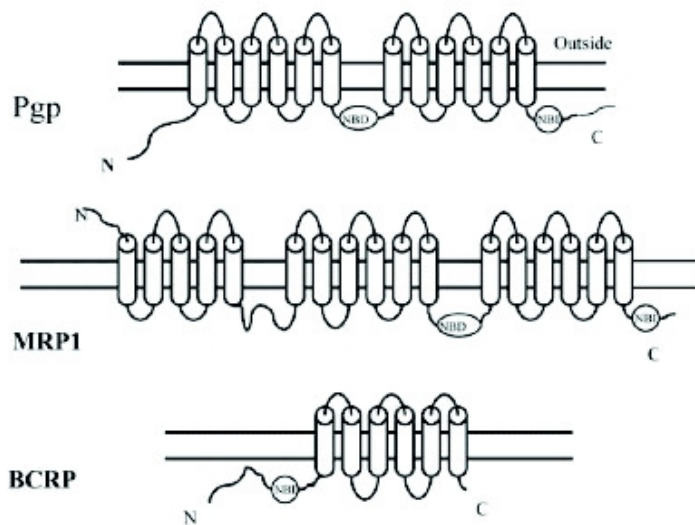


Abbildung 4: Sekundär Struktur von ABC-Transportern (Kuo, 2007)

Die beiden *full transporter* P-gp und MRP unterscheiden sich in ihrer Lokalisierung des NH₂-Terminus. Weiterhin besitzt MRP1 eine zusätzlich TMD aus fünf TMs. BCRP ist ein *half transporter* und besteht aus nur einer TMD und NBD.

2.2.2 FUNKTION

Das klassische Modell für den Mechanismus des Transportes besagt, dass eine Pore/Tunnel gebildet wird, welche eine konformative Änderung durchläuft, um die Substrate in den extrazellulären Bereich zu bewegen. Die Substrate sind dabei generell hydrophob und binden beim Eindringen in die Lipidschicht der Membran an die TMD. Dabei interagieren und kooperieren die N- und C- terminale Domäne miteinander, um diese Pore bilden zu können. Diese Transportfunktion kann jedoch nur gewährleistet werden, wenn ATP zur Verfügung steht, da die entstehende Energie genutzt wird, um die Substrate entgegen dem Konzentrationsgradienten durch die Membran zu transportieren (Higgins, 1992). Weiterhin wurde festgestellt, dass beide ATP-bindenden Seiten essentiell wichtig für die ATPase und die Effluxaktivität sind (Germann, 1998).

Diese Vermutungen konnten durch Röntgenstrukturbilder unterstützt werden (Abb. 5). Darauf aufbauend wird davon ausgegangen, dass das Substrat von der extrazellulären Seite in die

Lipid-Doppelschicht der Membran bis in die innere Schicht eindringt und dann durch ein offenes Portal an die innenliegende, hydrophile Substratbindungstasche des Transporters bindet (Locher, 2009). Durch die Bindung und Hydrolyse von ATP an der NBD wird eine Konformationsänderung hervorgerufen, wodurch das Substrat und die TMD an die äußere extrazelluläre Schicht gebracht werden. Dadurch wird das Substrat schon vor Eindringen in das Zytoplasma wieder ausgeschleust (Aller, 2009).

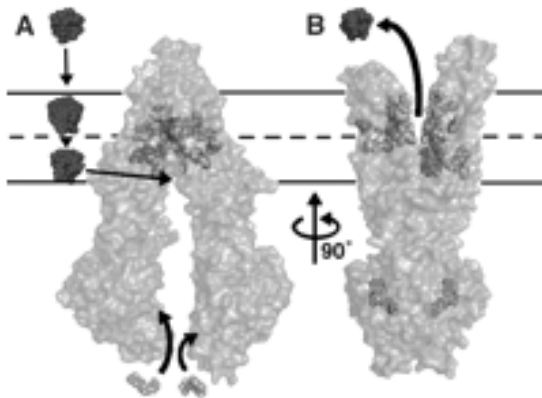


Abbildung 5: Substrat-Ausschluss durch einen ABC-Transporter (Aller, 2009)

Der ABC-Transporter fängt das Substrat während dem Eindringen in die Lipid-Doppel-Schicht ab. Dabei bindet das Substrat an die TMD, währenddessen zwei ATP an die zytoplasmatischen NBD binden und hydrolysiert werden. Durch die Energie kann das Protein seine Konformation verändern und das Substrat wird dadurch wieder in den extrazellulären Bereich gefördert.

Durch diesen Vorgang verhindern die ABC-Transporter die Akkumulation von endogenen Metaboliten, Phospholipiden und Xenobiotika in den ausgesetzten Lebewesen und Zellkulturen (Bard, 2000).

2.3 MDR/ MXR – SYSTEM

Die Unterfamilie der ABC-Transporter, welche die Aufgabe haben, den Organismus bzw. die Zelle vor potentiell gefährlichen Stoffen zu schützen, sind Teil eines komplexen zellulären Schutzsystems, welches je nach Betrachtung als MXR- oder MDR- System bezeichnet wird.

2.3.1 UNTERSCHIEDUNG UND VORKOMMEN

Tumorzellen weisen oft durch eine Überexpression von ABC-Transportern ein immunähnliches Schutzsystem, eine sogenannte „chemoimmunity“ (Sarkadi, 2006) auf, welches sie vor der toxischen Chemotherapie schützt (Szakács, 2009), indem die Arzneimittellkonzentration unter der Wirksamkeitskonzentration in der Krebszelle gehalten wird. Dieses *multidrug resistance* (MDR)-System wurde durch eine Studie über zelluläre Arzneimittelresistenzen definiert. Dabei wurde in ausgesuchten Zelllinien eine Kreuzresistenz gegen eine große Bandbreite an verschiedenen zytotoxischen Arzneimitteln, wie Antibiotika von Pflanzen und Pilzen, erkannt. Dieses Schutzsystem ist in vielen Krebszellen vorhanden,

wodurch die Chance auf Heilung durch eine Chemotherapie verringert wird, da die Impfstoffe aus den Krebszellen wieder herausgeschleust werden und somit nicht wirken können (Endicott, 1989).

Das Schutzsystem wird hingegen als *multixenobiotic resistance* (MXR) -System bezeichnet, wenn nicht der medizinische Aspekt, sondern die Umweltrelevanz im Vordergrund steht (Zucchi, 2010). Es ist ein fundamentaler, natürlicher Mechanismus, der Organismen vor der intrazellulären Akkumulation von schädlichen Stoffen schützt (Bard, 2000). Es bildet die erste Verteidigungslinie gegen natürliche Toxine und anthropogene Schadstoffe und wurde erstmals im Zusammenhang mit aquatischen Organismen von Kurelec erwähnt und in marinen Invertebraten, wie Muscheln (Kurelec 1989), Schwämmen (Kurelec, 1992) und Würmern (Toomey 1993) identifiziert und charakterisiert (Eufemia, 2000). Durch erhöhte Expressionen bestimmter ABC-Transporter in spezifischen Geweben werden sogenannte „Umwelt-Gewebe-Schranken“ gebildet, wie beispielsweise die Kiemen in Muscheln oder die Blut-Hirn-Schranke beim Mensch und weiteren Vertebraten, um die Aufnahme von Xenobiotika und Nährstoffen zu regulieren.

2.3.2 FUNKTION

Die primäre Rolle dieses Systems ist der Schutz der Zellen vor den einwirkenden Toxinen, da die Akkumulation der Giftstoffe in der Zelle verhindert wird. In beiden Schutzsystemen wird eine große Bandbreite an Substraten mit Hilfe eines oder mehrerer Transportmoleküle unter ATP-Verbrauch am Eindringen in die Zelle gehindert. Tritt jedoch der Fall ein, dass ein Stoff nicht erkannt wird und ungehindert in die Zelle eindringt, kann er von detoxifizierenden Enzymen (wie Cytochrom P450 und Glutathion-S-Transferase) zu einer hydrophileren Form modifiziert werden (Phase II). Das eingedrungene Substrat oder dessen Metabolite können aus der Zelle gepumpt werden, so dass der Schaden an der Zelle minimiert wird (Epel, 1998). Jedoch stellt das Ausschleusen an sich keine direkte Detoxifizierung dar, da die Substrate durch die ABC-Transporter nicht oxidiert, reduziert, hydrolysiert oder neu modifiziert werden (Phase I und II). Die ABC-Transporter bilden eine Etappe in den Detoxifizierungsprozessen, da sie die Substanzen am Eindringen hindern (Phase 0) und neu modifizierte Schadstoffe eliminieren können (Phase III) (Abb. 6) (Epel, 2008; Fent, 2007).

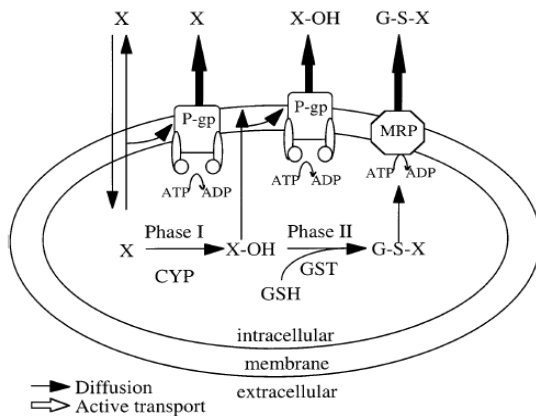


Abbildung 6: MXR/MDR-System (Bard, 2000)

Das MXR/MDR-System ist ein Zusammenspiel aus ABC-Transportern und detoxifizierenden Enzymen, wodurch die Detoxifizierung realisiert werden kann. Dabei übernehmen die ABC-Transporter Phase 0 und III, indem die Substrate X am Eindringen in die Zelle gehindert werden bzw. die Substrate X und deren Metabolite X-OH, G-S-X ausgeschleust werden.

Es gibt natürliche Stoffe, wie polyzyklische Moschus-Gemische (Luckenbach, 2005) und anthropogene Umweltstoffe, welche eine hohe Affinität zu der Substratbindungsstelle der ABC-Transporter besitzen und dadurch diese absättigen oder inhibieren können und somit den Schutzmechanismus gefährden. Dieser Mechanismus invertiert die MDR/MXR und wird als *chemosensitization* bezeichnet. Diese Stoffe, welche den Efflux der Substrate unterbinden, werden daher auch als *chemosensitizer* bezeichnet (Bard, 2000) und können die ABC-Transporter für eine längere Zeit inhibieren. Jedoch sind diese Stoffe nicht generell toxisch. Resultierend aus der kompetitiven Hemmung können toxische Substanzen aus der Umgebung in die Zelle eindringen und sich anreichern (Epel, 2008) und somit zu einer sekundär toxischen Wirkung führen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 VERWENDETE MATERIALIEN

3.1.1 GEWEBE/LARVEN-PROBEN

Die adulten Muscheln für die Gewebeentnahme wurden aus unterschiedlichen Gewässern entnommen.

Organismus	Herkunft
<i>Mytilus edulis</i>	Schweden , Europäische Nordsee
<i>Mytilus trossulus</i>	Kanada, Pazifik
<i>Dreissena polymorpha</i>	Deutschland, Kulkwitzer See

Die verwendeten Gewebe von *Mytilus edulis*, *Mytilus trossulus* und *Dreissena polymorpha* für die RNA-Isolation wurden in RNAlater eingelegt und bei -24 °C gelagert.

Adulte Muscheln der Art *Dreissena polymorpha* für die Reproduktion von Larven wurden aus dem Ribaroja-Stausee des Ebro-Flusses in Spanien gesammelt.

3.1.2 BAKTERIEN

Verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm	Herkunft
XL-Blue	Agilent Technologies
TOP 10	Invitrogen

3.1.3 VERWENDETE CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN

Tabelle 1: Chemikalienliste

Chemikalien	Formel	Hersteller	Reinheit	g/mol
Aceton	CH ₃ COCH ₃	Sigma-Aldrich	>99,9%	58,08
Agarose	C ₁₂ H ₁₈ O ₉	Roche Diagnostica	Grado Biologia Molecular	
Borsäure	H ₃ BO ₃	Merck	>99,8%	61,84
Calciumsulfatdihydrat	CaSO ₄ ·2H ₂ O	Riedel-de Haën	98-102%	172,17
Chloroform	CHCl ₃	Carlo Erba Reagents	99%	
Chlorthal-dimethyl	C ₁₀ H ₆ Cl ₄ O ₄	Sigma-Aldrich		331,96
Diethylpyrocarbonat	C ₆ H ₁₀ O ₅	Sigma-Aldrich		
Ethanol absolute	C ₂ H ₆ O	Carlo Erba Reagents	99,80%	
Ethidiumbromid	C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃	Fluka		394,33
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma-Aldrich	>99,4%	292,24

Glycerol	$C_3H_8O_3$	Merk	87%	
Isopropanol	C_3H_8O	Carlo Erba Reagents	99,70%	
Jod	I_2	Sigma-Aldrich	>99,5%	253,81
Kaliumchlorid	KCl	Carlo Erba Reagents	>99,5%	74,56
Kaliumchlorid	KCl	Sigma-Aldrich	>99%	74,56
Kaliumiodid	KI	Sigma-Aldrich	>99,5%	166,00
Magnesiumchlorid	$MgCl_2$	Merk	>99,5%	246,48
Magnesiumsulfat	$MgSO_4$	Merk	>99%	203,30
Magnesiumsulfatheptahydrat	$MgSO_4$	Sigma-Aldrich	>99%	246,48
Natriumchlorid	NaCl	Merck	>99,5%	58,44
Natriumhydroxid	NaOH	Carlo Erba Reagents		
Quecksilber(II)-chlorid	$HgCl_2$	Sigma-Aldrich	>99,5%	271,50
Serotonincreatininsulfatkomplex	$C_{14}H_{19}N_5O_2 \cdot xH_2O_4S$	Sigma-Aldrich		387,41
Natriumhydrogencarbonat	$NaHCO_3$	Sigma-Aldrich	99,7-110,3%	84,01
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	Roche Diagnostica	> 99,9 %	121,10
X-Gal	$C_{14}H_{15}BrClNO_6$	Applichem		408,63

Tabelle 2: selbsthergestellte Lösungen

Lösung	Menge	Reagenz
TBE	270,0 g	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	140,0 g	Borsäure
	18,4 g	EDTA
Lade-Puffer	0,6 ml	Glycerol
	20,0 µl	EDTA
	50,0 µl	Blaumethyl
	0,4 ml	Milli-Q
Lugol	100 g	Kaliumiodid
	50 g	kristallines Jod
	100 ml	Eisessig
	1 l	Milli-Q
Finnzymbuffer	10 ml	Tris (500mM)
	0,13 g	Magnesiumchloridhexahydrat
	0,396 g	Natriumsulfat
	0,2 ml	Tx-100
	8 ml	Milli-Q

Tabelle 3: geordnete Lösungen

Lösung	Nummer	Hersteller
RNAlater	1018087	QIAGEN
RNAlater	R0901-500ml	Sigma-Aldrich
Trizol		Invitrogen

3.1.4 MEDIEN FÜR BAKTERIENKULTIVIERUNGEN

Tabelle 4: benötigte Reagenzien für die Bakterienkultivierung

Reagenz	Hersteller
Bacto Agar	Becton, Dickinson
Bacto Tryptone	pronadisa Hispanlab
Hefe	pronadisa Hispanlab

Lösung	Menge	Reagenz
LB-Medium (Luria Bertani)	10,0 g	Bacto Tryptone
	5,0 g	Hefe
	10,0 g	Natriumchlorid
Platten	20,0 g	Bacto Agar
SOB-Medium	20,0 g	Bacto Tryptone
	5,0 g	Hefe
	2,0 ml	Natriumchlorid
	2,5 ml	Kaliumchlorid
	10,0 ml	Magnesiumchlorid
	10,0 ml	Magnesiumsulfat
	ad. 1 l	Milli-Q

3.1.6 ANTIBIOTIKA

Tabelle 5: verwendete Antibiotika

Antibiotika	Formel	Hersteller	Reinheit
Ampicillin	$C_{16}H_{19}N_3O_4S$	Sigma-Aldrich	91-100,5%
Kanamycin	$C_{18}H_{36}N_4O_1$	Sigma-Aldrich	91-100,5%

3.1.7 ENZYME

Tabelle 6: verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
EcoR1 (10U/μl)	Fermentas
BglII	Fermentas
Sall (10U/μl)	Fermentas
GoTaq-Polymerase	Pomega
Phusion™ High Fidelity Polymerase	Finnzymes
RiboLock RNase Inhibitor	Fermentas
M-MuLV Reverse Transkriptase	Fermentas
DNase	Roche

3.1.8 KITS

Tabelle 7: verwendete Kits

Name	Hersteller	Verwendung
LightCycler 480 SyberGreen 1 Master	Roche	qPCR
Nucleo Spin Extract	Machery-Nagel	DNA Gel extraktion
Nucleo Spin Plasmid	Machery-Nagel	Plasmid extraktion

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche	cDNA
SMARTer Race cDNA Amplification Kit User Manuel	Clontech	RACE_Ready cDNA
Advantage 2 Polymerase Mix	Clontech	RACE
InsTAclone PCR Cloning Kit K1213	Fermentas	Ligation
GeneJet Plasmid Minipräp Kit	Fermentas	Plasmid extraktion
GeneJet PCR Extraktion Kit	Fermentas	DNA extraktion
GeneJet Gel Extraktion Kit	Fermentas	DNA Gel extraktion
pCR 1.2 TA-Cloning Kit	Invitrogen	Ligation
pCR 2.1 blunt end Kit	Invitrogen	Ligation
GeneJet pCR II blunt end Kit	Fermentas	Ligation

3.1.9 LADDER-GRÖßENMARKER

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA ladder; ready to use; Fermentas

[bp] 3000 2000 1500 1200 **1000** 900 800 700 600 **500** 400 300
200 100

GeneRuler™ 1 kb Plus DNA ladder; ready to use; Fermentas

[bp] 20000 10000 7000 **5000** 4000 3000 2000 **1500** 1000 700 **500** 400
300 200 75

MassRuler™ Low Range DNA ladder; ready to use; Fermentas

[bp] **1031** 900 800 700 600 **500** 400 300 200 100 80

MassRuler™ DNA ladder; ready to use; Fermentas

[bp] **10000** 8000 6000 5000 4000 3000 2500 2000 1500 **1031** 900 800
700 600 **500** 400 300 200 100 80

3.1.10 PRIMER

für RT-qPCR

Gen	<i>forward</i> Primer	<i>reverse</i> Primer
MRP	GTATCAACCTGTCCGGTGGG	CCAGGGCGGTGTACAACAA
P-gp	CACCTGGACGTTACCAAAGAAGATATA	TCACCAACCAGCGTCTCATATTT
S3	CAGTGTGAGTCCCTGAGATACAAG	AACTTCATGGACTTGGCTCTCTG

Siehe Anhang 5

3.2 VERWENDETE GERÄTE

Tabelle 8: verwendete Geräte

Geräte	Typ	Hersteller
Brutschrank	Hybridisierungssofen	SHEL Lab
Dispergiergerät	T8.01 Ultraturrax	Kika Werke
Elektrophorese-Kammer		ecogen
Elektrophorese-Kammer	HU6	Roth Chemikalien

<i>Elektrophoresis Power</i>	EPS 600	Pharmacia Biotech
<i>Elektrophoresis Power</i>	EPS 3500	Pharmacia Biotech
<i>Elektrophoresis Power</i>	Standard Power P25	Biometra
<i>Elektrophoresis Power</i>	E132	Consort
Heizdeckel	Hot Bonnet	MJ Research
Heizer	TH-30	Edmund Bühler
Homogenisierer	Pellet pesttes Z359947	Sigma-Aldrich
Inkubator		Gallenkamp
Inkubator+Schüttler	Orbital Shaker	Forma Scientific
Kamera	M024778	
Kamera	C-740	Olympus
<i>LightCycler</i>	480	Roche
Mikroskop	Typ 104	Nikon
Mikrowelle	Mico-Ondas FM3310	Moulinex
Mikrowelle	8020 E	Privileg
Multikannalpipette	Finnpipette	Thermo Labsystems
Multiwellplatte	Lightcycler 480 - 96	Roche
Netzgerät	T8.01	Kika Werke
pH-Elektrode	SenTix41	WTW
pH-Meter	inoLab	WTW
Rührplatte	RETB	Kika Labortechnik
Safe-Lock-Tubes	0,5/1,5/2ml	Eppendorf
Schüttler	SM-20	Edmund Bühler
Spectrophotometer	NanoDrop 8000	Thermo Scientific
Sterilwerkbank	GAHD 2-453	KöthermannSystemlabor
Sterilwerkbank	KS15	Kendro Hera Safe
Thermoblock	Dri - BlockDB 2A	Techne
Thermocycler	Minicycler	MJ Research
Thermocycler	Multicycler PTC 220	Dyad
Thermocycler	T-Gradient 96	Biometra
Thermocycler	Personal Cyclor	Biometra
Thermomixer	comfort	Eppendorf
Thermomixer	comfort 5355	Eppendorf
Thermosublimationsdrucker	P 91	Mitsubishi
Thermosublimationsdrucker	UPD-895	Sony
Ultraschallbad	Ultrasous	J.p. Selecta
UV -Lampe	UVGL-25 254/366nm	San Gabriel
UV/Vis Spektralphotometer	NanoDrop ND1000	peQlab Biotechnologie
UVKammer	ECX-20M	ecogen
UVKammer	ECX-20M	ecogen
Vortex	VF2	IKA Labortechnik
Vortex	Analog Vortex Mixer	VWR
Waage	PJ3000	Mettler
Waage	BP 210 D	Sartorius
Waage	Analytic AC 210S	Sartorius
Waage	EW600-2M	Gottl.Kern&Sohn GmbH

Zentrifuge	GS - 6R	Beckmann
Zentrifuge	5810	Eppendorf
Zentrifuge	5424	Eppendorf
Zentrifuge	Biofuge 15	Heraeus Sepatech
Zentrifuge	Universal 30 F	Hettich
Zentrifuge	DW-41-230	Qualitron
Zentrifuge	G-Biofuge fresco	Heraeus Instruments

3.3 VERWENDETE SOFTWARE

Für die Durchführung und Auswertung der ausgeführten Experimente wurde eine Anzahl an verschiedenen Softwareprogrammen genutzt. Für die Erstellung von Primern für die RT-qPCR wurden die bekannten Sequenzabschnitte in den Beakon Designer oder Primerexpress geladen und die gewünschten Parameter, wie Produktlänge, Primerlänge, Schmelztemperatur von Primer und Produkt festgelegt. Die erstellten Primer wurden mit NetPrimer und Oligo Analyzer auf die Schmelztemperatur, GC-Gehalt und sekundäre Strukturen überprüft. Die amplifizierten Sequenzabschnitte wurden in Sequencher zu einem vollständigen Gen zusammengefasst und ihre Qualität überprüft. Mit Hilfe von Mega 4 und ClustalX 2.0 konnten die erhaltenen Gene hinsichtlich ihrer Ähnlichkeit verglichen und Stammbäume erstellt werden. Die Struktur der Gene auf Aminosäureebene wurde mit Hilfe von Prosite (<http://expasy.org/prosite/>) und dem Polyphobiusalgorithmus (<http://phobius.sbc.su.se/poly.html>) charakterisiert. Die aus der RT-qPCR resultierenden genetischen Expressionsstudien wurden mit SPSS Statistics 10.0 statistisch ausgewertet, um verlässliche Aussagen treffen zu können.

3.4 GEWINNUNG VON MUSCHELEMBRYONEN UND DEREN EXPOSITION MIT TOXISCHEN SUBSTANZEN

3.4.1 HERKUNFT UND HALTUNG DER VERWENDETEN MUSCHELN

Die Zebrauschel *Dreissena polymorpha* hat ihre Laichzeit in Abhängigkeit von den Temperaturen in den Sommermonaten im Zeitraum von April bis August. Während dieser Periode wurden die geschlechtsreifen Muscheln aus seichtem Wasser (0,5-1 m tief) des Flusses Ebro in Spanien gesammelt und in 10 l Aquarien in ASTM-Wasser zu je 200 Tieren gehalten. Durch eine relativ niedrige Wassertemperatur von 21 °C wurde das Laichen der Muscheln unterbunden. Die Aquarien wurden mittels Pumpen belüftet. Der Hell/Dunkel-Rhythmus mit Kunstlicht war 12/12 Std.. Die Testtiere wurden wöchentlich mit einer Algensuspension gefüttert (Abb. 7).

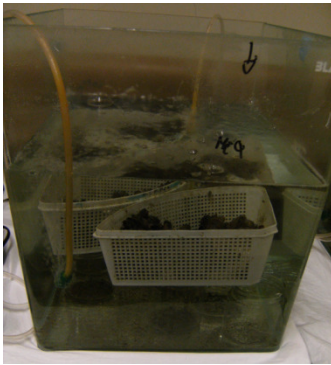


Abbildung 7: Haltung der *Dreissena polymorpha* unter Laborbedingungen

Die adulten Testorganismen der Art *Dreissena polymorpha* wurden zu je 200 Tieren in belüfteten und rhythmisch 12/12 Std. beleuchteten 10 l Aquarien gehalten.

3.4.2 GEWINNUNG DER MUSCHELEMBRYONEN

In der vorliegenden Arbeit wurden die Muscheln mit dem Neurotransmitter Serotonin zum Ausstoßen der Geschlechtszellen ins Wasser angeregt. Es wurden 30 bis 50 Muscheln in eine Plastikschiene gelegt und in eine Lösung mit 1 mM Serotonin-Kreatininsulfat-Monohydrat getaucht. Nach 5 bis 10 min begannen männliche Muscheln Sperma abzugeben, was als Startpunkt für die Serotoninwirkung gesehen wurde. Die Muscheln wurden gründlich mit vollentsalztem Wasser gewaschen, da das Serotonin toxisch für die Larven ist. Danach wurden die Muscheln für weitere 5 min mit ASTM-Wasser bedeckt und anschließend einzeln isoliert, da zu viel Sperma zu deformierten Eiern führen würde und diese somit nicht lebensfähig wären. Weiterhin entsteht eine große Verunreinigung, da die Muscheln neben Eiern und Sperma ihre Exkremente ausstoßen. Durch die Isolierung konnten die Muscheln spezifisch gereinigt werden. Um die Weibchen zur Eiablage bzw. die anderen Männchen zur Spermaabgabe anzuregen, wurden wenige Tropfen des Spermas in alle Gläser gegeben. Nach Sperma/Eiablage konnten die Muscheln als Männchen oder Weibchen identifiziert und dementsprechend geschlechtsgetrennt in einem Becherglas

gesammelt werden. Mit Hilfe eines Siebes wurden die Eier in der Lösung aufkonzentriert und in einem separaten Becherglas gesammelt, da die Weibchen die Eier durch ihre Filteraktivität wieder einsaugen würden. Es wurden in 250 µl der Eierlösung die Anzahl der Eier mit Hilfe eines Mikroskops bestimmt. Nach Erreichen der gewünschten Konzentration an Eiern wurde in kleiner Menge solange Sperma hinzugegeben, bis die Menge ausreichend für die Befruchtung aller Eier war, welches unter dem Mikroskop beobachtet wurde (Faria, 2010).

3.4.3 ERMITTLUNG DER TOXIZITÄT VON DACTHAL FÜR EMBRYONEN VON *DREISSENA POLYMORPHA*

Zur Ermittlung einer nicht-toxischen Dacthal-Konzentration für die Expositionsversuche zur Untersuchung der Wirkung der Substanz auf die Genexpression wurden Toxizitätstests mit zwei Dacthal-Konzentrationen (1 ppm und 10 ppm) in zwei Replikaten durchgeführt. Der Kontrollansatz enthielt Aceton, da Aceton als Lösungsmittel für Dacthal benutzt wurde. Die Zusammensetzung der Testansätze ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Zusammensetzung der verschiedenen Behandlungen für den Toxizitätstest

Behandlung	ASTM	Aceton	Dacthal
Lösungsmittel	100 ml	34 µl	-
Dac 1 ppm	90 ml	34 µl	10 ml (von Dac 10 ppm)
Dac 10 ppm	100 ml	-	34 µl (von Dacthal-Stammlösung: 29475 ppm)

In Bechergläser mit 40 ml Expositionsmedium je Behandlung wurden 4000 befruchtete Eier gegeben, da die Konzentration in etwa 10 Embryonen/ml Medium betragen sollte. Nach 24 Std. Inkubationszeit bei 20°C im Dunkeln wurde der Inhalt der Bechergläser in 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Dabei wurden die Bechergläser nicht geschüttelt, da nur die in der Lösung flotierenden, lebenden Veligerlarven berücksichtigt werden sollten. Durch die Zugabe von 500 µl Lugolsche-Lösung wurden die Larven abgetötet. Nach 2 Std. Lagerung im Kühlschrank bei 10°C wurden die Falcon-Röhrchen für 2 min bei 2000 rpm und 4°C zentrifugiert, wobei sich die Larven am Boden absetzten. Der Überstand wurde bis zu einem Endvolumen von 3 ml abgepumpt. Die Larven wurden dem Überstand resuspendiert und die normal und fehlentwickelten Larven wurden in 300 µl ausgezählt. Dazu wurden einige Merkmale betrachtet, wie Form, Größe und Organverteilung. Alle normal entwickelten Larven sollten Zilien und eine D-Form besitzen, sowie gleichmäßig dunkel durch Lugol angefärbt sein. Vergrößerte, runde und durchscheinbare Larven hingegen wurden als fehlentwickelt betrachtet. Physikalische Effekte, wie zerbrochene Schalen, wurden nicht beachtet, da diese durch das Filtrieren und Zentrifugieren entstehen können.

Für die statistische Auswertung der Anzahl der fehlentwickelten Larven wurde einerseits der prozentuale Anteil der anormalen Larven ausgehend von der Gesamtheit der Larven berechnet. Da unterschiedliche Ausgangsvolumina vorhanden waren, bestand eine andere Möglichkeit in dem Fisher's Exakt Test. Dieser wurde eingesetzt, um Aussagen zu den Unabhängigkeiten bzw. Abhängigkeiten zwischen den unterschiedlichen Behandlungen treffen zu können. Ein P-Wert >0.05 gibt an, dass die ermittelten Werte sich unabhängig von der Behandlung verhalten und somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen vorliegen.

3.4.4 ERMITTLUNG EINES EFFEKTS AUF DAS MXR-SYSTEM DURCH EXPOSITIONSVERSUCHE MIT *DREISSENA POLYMORPHA*

Die Expositionsversuche wurden als *early life stage* Test der *Dreissena polymorpha* dreimal mit unterschiedlichen Larvenstadien zwei verschiedener Muschelpopulationen durchgeführt. Als chemische Stressauslöser wurden Dacthal und anorganisches Quecksilber verwendet, wobei je Versuch die gleichen Stammlösungen verwendet wurden (Tab. 10). Aus dem Toxizitätstest folgend, wurde Dacthal in den Konzentrationen 0,5 und 2 ppm eingesetzt.

Tabelle 10: Zusammensetzung der verschiedenen Behandlungen für die Expositionsversuche

Behandlung	ASTM	Aceton	Dacthal-Stammlösung (14690 ppm)	Anorganische Quecksilber-Stammlösung (5650 ppb)
Kontrolle	10 l	-	-	-
Lösungsmittel	10 l	1,36 ml	-	-
Dac 0,5 ppm	10 l	1 ml	0,34 ml	-
Dac 2 ppm	10 l	-	1,36 ml	-
Hg 1 ppb	10 l	-	-	1,77 ml

Die Ansätze erfolgten in je 10 l Flaschen mit je 2 Replikaten pro Behandlung. Pro Flasche wurden 50.000 Larven (1 Tag alt) bzw. 100.000 Embryonen (wenige Stunden alt) zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 Std. bei 21 °C wurden alle Flaschen abfiltriert und in 50 ml Falcon-Röhrchen konzentriert sowie die Anzahl an überlebten Larven bestimmt, wobei nicht nach fehlentwickelten und normalen Larven unterschieden wurde. Das Falcon wurde für 15 min bei 2500 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis 4 ml abgesaugt. Das Konzentrat wurde auf 2 ml-Eppendorfröhrchen aufgeteilt, wonach die Zahl der Larven zwischen 25.000-50.000 liegen sollte. Danach wurde erneut bei 2000 rpm für 2 min zentrifugiert, sodass sich ein Niederschlag am Boden bildete, und der restliche Überstand verworfen. Dann wurde 1 ml Trizol zugegeben.

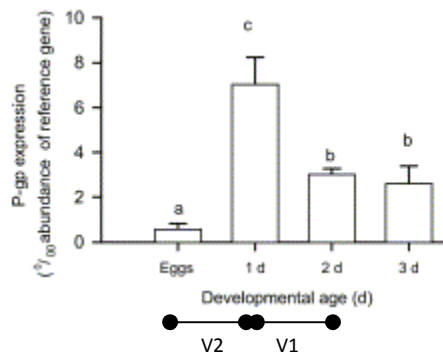


Abbildung 8: Darstellung der P-gp Expression in verschiedenen Larvenstadien (Faria, 2010)

Die P-gp Expression steigt stark bis zum ersten Tag nach der Befruchtung der Eier an und nimmt danach wieder ab. Die Versuchsperioden sind mit V gekennzeichnet.

Es war bekannt, dass die P-gp-Expression in den Larven einen Tag nach der Fertilisation am höchsten ist (Faria, 2010). Daraus schließend wurde ein Expositionsversuch mit einen Tag alten Larven (V1), welche schon zu Beginn eine hohe P-gp-Expression aufweisen, und zwei mit Embryonen (V2) durchgeführt, welche eine natürliche Erhöhung der P-gp-Expression zum Versuchsende hin aufzeigen (Abb. 8). Die verwendeten Muschelpopulationen unterschieden sich in der Dauer der Haltung unter Laborbedingungen. Es wurden neu gesammelte und einen Monat unter Laborbedingungen gehaltene, adulte Muscheln für die Gewinnung der Muschelembryonen verwendet.

3.5 RNA – ISOLIERUNG MIT DER GTC-METHODE

3.5.1 GRUNDLAGEN

Im Folgenden wird die RNA-Isolierung aus dem Gewebe adulter Muscheln und aus den Muschelembryonen geschildert. Vor der Beschreibung der Vorgehensweise werden zunächst die für die Methode wichtigen theoretischen Grundlagen erläutert.

In der DNA wird die genetische Information als Sequenz aus 4 verschiedenen Basen verschlüsselt, welche in proteinkodierenden Genen die Baupläne für Proteine enthält. Dabei wird die Richtung des Informationsfluss von der DNA zur RNA und dann zum Protein ausgeführt. Durch die Transkription wird die DNA-Sequenz in die einzelsträngige RNA-Sequenz umgeschrieben, wodurch Kopien der Baupläne für Proteine als mRNA entstehen (Bielka, 1995). Diese Kopien dienen als Vorlage für die Translation im Zytoplasma, in welcher die Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz des Proteins umgeschrieben wird. Jedes Gen kann dabei in unterschiedlichen Mengen transkribiert und translatiert werden, wobei dies an die Bedürfnisse des Zeitpunktes angepasst ist (Alberts, 2005).

Die mRNA wird erst als höhermolekulare prä-mRNA synthetisiert, welche durch Prozessieren in eine reife funktionsfähige mRNA umgewandelt wird. Diese Prozessierung

umfasst das Verkürzen des Moleküls, in dem die Introns durch spezifische Nukleasen im Prozess des Spleißens entfernt werden, sowie die Modifizierung des 5'- und 3'-Endes, wodurch die mRNA eine höhere Stabilität gegen einen enzymatischen Abbau erhält. An das 3'-Ende werden Adenylsäurereste angefügt, der sogenannte „Poly(A)-Schwanz“, und das 5'-Ende erhält eine cap-Struktur, ein methyliertes G-Nukleotid. Durch das Spleißen, die Polyadenylierung und das RNA-*caping* im Zellkern entsteht eine monocistronische mRNA, welche 10-mal kürzer ist als die prä-mRNA. Diese mRNA liegt im Cytoplasma und besteht aus einer ununterbrochenen Nukleotidsequenz, welche wiederum aus einem *open reading frame* (ORF), der ein bestimmtes Polypeptid codiert, und regulatorischen, nicht kodierenden Bereichen besteht (UTR=*untranslated region*) (Karp, 2005). Die Translation kann dabei in drei möglichen Leserahmen erfolgen, da in Gruppen von jeweils drei Nukleotiden gelesen wird. Durch Start (AUG)- und Stoppcodons (UAA, UAG, UGA) wird bestimmt, welcher Leserahmen gewählt wird (Alberts, 2005; Bielka, 1995; Mülhardt, 2009).

Aus den genannten Gründen ist es daher besser, anstatt der DNA die mRNA zu sequenzieren, weil nur der aminosäurekodierende Teil (Exon) vorhanden ist. Außerdem können durch die Anzahl der Kopien einer mRNA Rückschlüsse auf die Notwendigkeit eines Proteins in der Zelle geschlossen werden. Deswegen wurde die gesamte RNA der untersuchten Probe nach der klassischen GTC-Methode (Phenol/Chloroform/Guanidinium-Isothiocyanat-Methode) isoliert. Durch diese Methode, welche auch als AGPC-Methode (*acid guanidium-phenol-chloroform*) bezeichnet wird (Chomczynski, 1986), kann eine hohe RNA-Ausbeute erzielt werden (Zähringer, 2010). Die gesamten Schritte zur RNA-Isolation wurden auf Eis und in einem möglichst RNase freien Bereich, einer Sterilwerkbank, ausgeführt. Im ersten Schritt wurde die Probe homogenisiert und durch die Zugabe von Phenol, Natriumacetat und Chloroform eine Phasentrennung erzielt. Durch eine Interphase, welche aus denaturierten Proteinen und DNA besteht, wurden zwei flüssige Phasen voneinander getrennt. In der unteren organischen Phase befand sich die gelöste DNA. Dabei befand sich die extrahierte RNA in der oberen wässrigen Lösung. Durch Isopropanol wurde die RNA ausgefällt und das erhaltene Pellet mit 75% Ethanol gewaschen und getrocknet, um die restlichen Salze und Isopropanolreste zu entfernen. (Chomczynski, 1986). Mit Hilfe einer Gelelektrophorese und eines Spektralphotometers wurde die Qualität der in RNase-freiem DEPC-Wasser gelösten RNA kontrolliert werden. Da die gesamte RNA extrahiert wurde, mussten auf dem Gel für Säuger zwei Banden zu sehen sein (18S und 28S RNA). Bei anderen Organismen, wie Muscheln, kann auch nur eine Bande sichtbar sein. (Karp, 2005).

3.5.2 RNA-ISOLIERUNG AUS DEM GEWEBE ADULTER MUSCHELN

Die zu untersuchenden Gewebe-Proben, welche in RNAlater bzw. Trizol bei -20 °C gelagert wurden, wurden aufgetaut und mit Hilfe einer Schere und Pinzette ca. 50 mg der Probe

abgenommen auf Zellstoff abgetupft, in 2 ml Röhrchen gegeben und 1 ml Trizol hinzugefügt. Die Probe wurde durch einen Ultra-Turrax homogenisiert, wobei Blasen-Bildung vermieden wurde, da dadurch Scherkräfte entstehen, welche die RNA zerstören könnten. Nach der Zugabe von 200 µl Chloroform wurde die Lösung für 15 sek geschüttelt, danach für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 15 min bei 12000 g zentrifugiert. Die dabei entstandene wässrige Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und 500 µl Isopropanol zugegeben. Nach kurzem Schütteln wurde die Suspension für 30 min bei -20°C gelagert und nachfolgend für 15 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert, sodass sich ein gelähnliches Pellet am Boden bildete. Der Überstand wurde abpipettiert und durch die Zugabe von 1 ml 75% Ethanol das Pellet gewaschen. Die Probe wurde gevortext bis sich das Pellet von der Wand gelöst hatte und danach für 10 min bei 4°C und 12000 g zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das gebildete weiße Pellet für 20 min bei 37°C im Hybridisierungssofen getrocknet, damit das restliche Ethanol verdampfte. Nach der Zugabe von 25 µl DEPC-H₂O wurde die RNA für 10 min bei 60°C gelöst.

3.5.3 RNA-ISOLIERUNG AUS MUSCHELEMBRYONEN

Die Phenol-Extraktion der gesamten RNA aus Embryonen der *Dreissena polymorpha* erforderte lange Inkubationszeiten und mehrere Reaktionsschritte, da durch die in der Flüssigkeit schwebenden Larven die Isolation erschwert wurde. Die Proben der inkubierten Larven wurden bei 4°C in 2 ml Röhrchen bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Die RNAlater-Lösung mit den flotierenden Larven wurde aus den 2 ml-Röhrchen in 1,5 ml-Röhrchen überführt und für 15 min bei 15000 rpm zentrifugiert. Während dieser Zeit wurde in die 2 ml Röhrchen 500 µl Trizol gegeben und geschüttelt, um die an der Wand adsorbierten Larven zu lösen. Nach der Zentrifugation wurde mit Hilfe einer Pipette der RNAlater-Überstand vorsichtig entfernt, um nicht die Larven mit abzusaugen. Anschließend wurde das Trizol mit den restlichen, von der Wand gelösten Larven aus dem 2 ml Röhrchen in das 1,5 ml Röhrchen überführt und die Lösung mit Hilfe eines *pellet pestles* homogenisiert, wobei die Zellwand der Larven zerstört wurde. Dann wurden nochmals 500 µl Trizol zugeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Folgenden wurde, wie oben für das Gewebe beschrieben, vorgegangen, mit dem Unterschied, dass, nach der Überführung des RNA-haltigen Überstandes in ein neues Röhrchen, die Schritte Trizol-, Chloroformzugabe, die entsprechenden Inkubationszeiten und die anschließende Zentrifugation wiederholt wurden, um das RNAlater vollständig zu entfernen und somit eine reine RNA-Lösung zu erzielen.

3.6 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN

Das Spektralphotometer Nanodrop kann einerseits die Konzentration an Nukleinsäuren im Bereich von 2-2700 ng/µl in einer Probe bestimmen und andererseits eine Aussage über die

Reinheit der Probe treffen. Dazu wurde das Gerät zuvor kalibriert, indem 1,5 µl MilliQ-H₂O und dann 1,5 µl des Lösungsmittels aufgetragen wurden. Für RNA wurde als Lösungsmittel DEPC-H₂O und für DNA Elutionspuffer verwendet. Die zu untersuchende Probe wurde gevortext, um eine gleichmäßige Verteilung der Nukleinsäuren zu garantieren. Danach erfolgte die OD-Messung von 1,5 µl der Probe bei einer Wellenlänge von 260 nm, wobei beim Auftragen der Probe eine Blasenbildung vermieden wurde. Aus dem ermittelten Wert wurde von der zugehörigen Software die Konzentration nach folgender Formel 1 berechnet.

$$c \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = OD_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der Ausgangslösung

F = Multiplikationsfaktor (RNA=40; dsDNA=50; ssDNA=33)

V = Verdünnungsfaktor

OD₂₆₀ = Absorption bei 260 nm

Formel 1: Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Für die Bestimmung der Reinheit wurden die Verhältnisse von OD 260/280 und OD 260/230 bestimmt. Bei einer OD 260/280 von über 1,7 konnte eine Proteinkontamination ausgeschlossen werden und eine OD 260/280 bei rund 2 gibt an, dass keine Salze in der Probe enthalten sind (Mülhardt, 2009).

3.7 REVERSE TRANSKRIPTION (cDNA – SYNTHESE)

3.7.1 HINTERGRUND

Als Grundlage für die Durchführung der cDNA-Synthese und der folgenden Auswertung ist es notwendig den Hintergrund der verwendeten Materialien und Techniken zu kennen, welcher im Folgenden kurz erläutert wird.

Im Zentralen Dogma der Molekularbiologie nach Francis Crick wurde der mögliche Informationsfluss RNA in DNA umzuschreiben als Reverse Transkription beschrieben. Diese Möglichkeit besitzen Retroviren, um sich somit in das Wirtsgenom einzubinden. Dieses wurde sich in den Techniken der Molekularbiologie zu Nutzen gemacht, um die gewonnene RNA in cDNA (*complementary DNA*) mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase umzuwandeln. Die entstehende DNA besitzt den Vorteil, dass sie keine Introns besitzt (Clark, 2005), jedoch kann die Reverse Transkriptase kein *Proofreading* bei der Synthese durchführen (Alberts, 2005).

Die verwendete Reverse Transkriptase M-MuLV RT aus dem Virus *Moloney murine leukemia* ist eine RNA- und DNA-abhängige Polymerase, welche durch eine Mutation in der RNase H-Domäne keine RNase H-Aktivität mehr besitzt und dadurch längere Transkripte ermöglicht und höhere Temperaturen verträgt. Das Prinzip für die cDNA-Synthese ist wie folgt: Die RNA und die Oligo-dT Primer werden zusammen auf 70°C erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen, danach werden sie auf Raumtemperatur

abgekühlt, damit sich die Primer an den Poly(A)-Schwanz anlagern können. Danach wird der Puffer, Ribonuklease-Inhibitor und die Reverse Transkriptase zugegeben und bei 42°C inkubiert. Zuvor wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, damit keine genomische DNA während einer PCR (*Polymerase chain reaction*) mit amplifiziert wird (Mülhardt, 2009; Zilinskiene, 2008).

3.7.2 SYNTHESE DER cDNA FÜR KONVENTIONELLE PCR UND RT-qPCR

Nach der Konzentrationsbestimmung der extrahierten gesamten RNA wurde die benötigte Menge an RNA-Lösung für die cDNA-Synthese nach Formel 2 berechnet. Generell wurden für eine konventionelle PCR eine cDNA mit einer Konzentration von 100 ng/μl verwendet und somit im Ausgang 4000 ng RNA benötigt. In der RT-qPCR konnte in Abhängigkeit der Primereffizienz die benötigte Konzentration an cDNA bestimmt werden. In den durchgeführten RT-qPCR-Analysen wurde eine auf die Konzentration von 50 ng/μl verdünnte cDNA-Lösung eingesetzt.

$$x = \frac{y \text{ ng}}{\text{RNA-Konzentration ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}}$$

y = Menge an RNA für cDNA-Synthese

Formel 2: Berechnung der eingesetzten Menge an benötigter RNA für die cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese für die konventionelle und RT-qPCR wurde durch folgende Zusammensetzung und Temperaturprofil durchgeführt (Tab. 11+12).

Tabelle 11: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die cDNA – Synthese

Reagenz	eingesetzte Menge	
DNase Buffer (10xD)	2 μl	20 μl Mix ①
DNase	1 μl	
total RNA	x	
DEPC H ₂ O	17 μl - x	
DEPC H ₂ O	1 μl	12 μl Mix ②
RNAse Inhibitor	1 μl	
dNTPs	4 μl	
Reaction Buffer (x5)	8 μl	
Oligo dT	4 μl	③
Reverse Transkriptase	2 μl	④
40 μl (100ng/μl)		

Tabelle 12: Temperatur-Zeitverlauf der cDNA - Synthese

Temperatur	Zeit
→ Mix ①	
25° C	35 min
75° C	10 min
4° C	∞
→ ③ zugeben	
70° C	5 min
4° C	∞
→ Mix ② zugeben	
37° C	5 min
4° C	∞
→ ④ zugeben	
42° C	75 min
70° C	10 min
4° C	∞

3.7.3 SYNTHESE DER cDNA FÜR RAPID AMPLIFICATION OF cDNA ENDS (RACE) PCR

Für die Ermittlung der unbekannten Sequenz-Regionen Richtung 5'- und 3'-Ende einer mRNA wurde je eine speziell modifizierte cDNA für die Sequenzierung des 5'- und des 3'-Endes benötigt. Dabei wurden an das 5' und 3'-Ende bekannte Sequenzfolgen angehängt.

Die 5'-RACE Ready und 3'-RACE Ready-cDNA wurden nach folgendem Temperaturverlauf (Tab. 15) und in verschiedenen Reaktionsansätzen (Tab. 13+14) hergestellt.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für 5'-RaceReady cDNA

5'-RaceReady cDNA		
Reagenz	eingesetzte Menge	
total RNA	x	3,75 µl Mix ①
5'-CDS Primer	1 µl	
steriles Wasser	2,75 µl - x	
SMARTer A oligo	1 µl	6,25 µl Mix ②
5x First Strand Buffer	2 µl	
DDT (20mM)	1 µl	
dNTP Mix (10mM)	1 µl	
RNAse Inhibitor (40U/µl)	0,25 µl	
SMARTScribe Reverse	1 µl	
Transkriptase (100U)		
10 µl (100ng/µl)		

Tabelle 14: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für 3'-RaceReady cDNA

3'-RaceReady cDNA		
Reagenz	eingesetzte Menge	
total RNA	x	4,75 µl Mix ①
3'-CDS Primer	1 µl	
steriles Wasser	3,75 µl - x	
5x First Strand Buffer	2 µl	5,25 µl Mix ②
DDT (20mM)	1 µl	
dNTP Mix (10mM)	1 µl	
RNAse Inhibitor (40U/µl)	0,25 µl	
SMARTScribe Reverse	1 µl	
Transkriptase (100U)		
10 µl (100ng/µl)		

Tabelle 15: Temperatur– Zeitverlauf für die cDNA–Synthese

Temperatur	Zeit
→ Mix ①	
72° C	3 min
42° C	2 min
→ Mix ② zugeben	
42° C	90 min
70° C	70 min

Im Ausgang wurden für die RACE-Ready cDNA 1000 ng der gesamten RNA eingesetzt und die benötigte Menge an RNA-Lösung berechnet (Formel 2).

Nach Beendigung der cDNA-Synthese wurde 100 µl Tricin-EDTA zugegeben, um eine cDNA-Lösung mit einer Konzentration von rund 1 ng/µl zu erhalten.

3.8 ERMITTLUNG DER PRIMER-SEQUENZEN FÜR PCR

Die Erstellung von Primern für die gewünschte Amplifikation wurde per Hand oder mit Hilfe von speziellen Softwares durchgeführt. Dabei wurden die gleichen Richtlinien eingehalten. Die Primer sollten eine Länge von 18–30 bp und einen GC-Gehalt von 50-60 %, besitzen um eine Schmelztemperatur T_M von über 55°C und somit eine höhere Spezifität zu erreichen. Eine GC-Klammer diene einer besseren Bindung und Elongation der Primer. Es wurden keine vier aufeinanderfolgenden gleichen Basen gewählt, um Fehlhybridisierungen und *frameshifts* zu vermeiden. Durch die Programme (wie <http://eu.idtdna.com/analyzer/>

applications/oligoanalyzer/Default.aspx) wurden die T_M der Primer berechnet und die Primer auf Sekundärstrukturen, wie *hairpin loops* und Primerdimer untersucht (Mülhardt, 2009).

Für die Erstellung von Primerpaaren mit Beakon oder Primerexpress für die RT-qPCR wurde beachtet, dass die zu amplifizierende Produktlänge zwischen 80–100 bp liegt, da kürzere Fragmente besser denaturieren können und so die Primer besser gebunden werden. Weiterhin wurden hoch konservierte Stellen für das Primerdesign gewählt (Bustin, 2000). Die Spezifität der Primer wurde über <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> untersucht.

Die geordneten Primer wurden lyophilisiert geliefert und mit Elutionspuffer auf 100 mM gelöst.

3.9 KONVENTIONELLE POLYMERASE – KETTENREAKTION (PCR)

3.9.1 ALLGEMEIN

1993 erhielt Kary Mullis den Nobel Preis in Chemie für die Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) (Clark, 2005), welche das natürliche Prinzip der DNA-Replikation nachahmt (Holzapfel, 2007). Die Vermehrung schon geringer DNA-Mengen erfolgt *in vitro* durch sich ständig wiederholende Replikationszyklen, wobei Milliarden Kopien der gewünschten Sequenz produziert werden (Alberts, 2005). Die Replikationsrunden bestehen aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation, welche 30- bis 40- mal wiederholt werden und somit zu einer exponentiellen Amplifikation 2^n der Zielsequenz führen (Saiki, 1988).

Dazu wurde als erstes der Originalstrang bei 90–95°C aufgeschmolzen (Denaturierung) wodurch einzelsträngige DNA-Moleküle entstanden. Danach lagerten sich gegenläufig orientierte Oligonukleotide (Primer) an die jeweils komplementäre Sequenz bei 55-60°C an (Annealing), welche als Startmoleküle für die hitzestabile DNA-Polymerase zur Verlängerung der Zielsequenz bei 72°C dienten (Elongation). Die amplifizierte Sequenz wurde dabei durch die Auswahl der Primer bestimmt, da es sich um den zwischen den Primern liegenden Abschnitt handelte (Bielka, 1995). Die Bindung der Primer an das template und das Bilden einer spezifischen Sequenz resultierte aus der Annealingtemperatur.

$$T_A = T_M - 3^\circ\text{C}$$

Je niedriger T_A , umso unspezifischer ist die Bindung und umso höher T_A , umso ineffizienter läuft die Bindung und die Elongation ab (Nolan, 2009).

3.9.2 VERWENDETE POLYMERASEANSÄTZE UND IHRE ANWENDUNG

Die Qualität und die Art der synthetisierten PCR-Produkte waren mit von der verwendeten Polymerase während der PCR abhängig, welche im Folgenden kurz erläutert werden.

Die am häufigsten verwendete Polymerase war die thermophile Taq-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde, die in 90°C heißen Quellen leben (Karp, 2005). Die Taq-Polymerase besitzt eine 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität sowie eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität und keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Jedoch hat sie eine *template*-unabhängige Polymeraseaktivität, wodurch eine zusätzliche Base Adenosin an das Ende eines neusynthetisierten Stranges angehängt wird (*sticky ends*). Die Syntheserate liegt bei 2800 Basen/min und dabei entsteht aller 1000 bp circa ein Fehler, so dass sie bis zu einer Fragmentgröße von 1000 bp genutzt wurde (Mülhardt, 2009).

Für die Amplifizierung großer Fragmente wurde Phusion-Polymerase verwendet. Diese besitzt neben einer höheren Temperaturstabilität eine zusätzlich 3'-5'-Exonukleaseaktivität, wodurch eine Korrekturfähigkeit (*proofreading*) garantiert wird und somit eine geringere Fehlerrate (aller 10⁶ Basen) vorhanden ist (Mülhardt, 2009). Die Phusion-Polymerase ist ein neuartiges Enzym ähnlich der Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, mit einer dsDNA-bindenden Seite, wodurch die Affinität zur DNA erhöht wird und sie somit doppelt so schnell wie die Taq-Polymerase synthetisiert (30 s/kb). Jedoch besitzen die gebildeten PCR-Produkte keinen Basenüberhang (*blunt ends*) (Finnzymes, 2007).

Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der verwendeten Polymerasen unterschieden sich die jeweiligen PCR-Ansätze in ihrer Zusammensetzung (Tab. 16+17) sowie in den verwendeten Temperaturprogrammen (Tab. 18+19) (Promega, 2008; Finnzymes, 2007).

Tabelle 16: Reaktionsansatz für Taq-Polymerase

Reagenz	eingesetzte Menge	
MiliQ H ₂ O	30,7	µl
GoTaq Flexi Buffer (5x)	10	µl
cDNA (100ng/µl)	2	µl
MgCl ₂ -Lösung (25mM)	4	µl
dNTPs Mix(10mM)	1	µl
Forwärts Primer (10mM)	1	µl
Rückwärts Primer (10mM)	1	µl
GoTaq DNA Polymerase (5U/µl)	0,3	µl
	50	µl

Tabelle 17: Reaktionsansatz für Phusion-Polymerase

Reagenz	eingesetzte Menge	
MiliQ H ₂ O	34,5	µl
Phusion HF Buffer (5x)	10	µl
cDNA (100ng/µl)	2	µl
dNTPs (10mM)	1	µl
Forwärts Primer (10mM)	1	µl
Rückwärts Primer (10mM)	1	µl
Phusion DNA Polymerase (2U/µl)	0,5	µl
	50	µl

Tabelle 18: Temperatur- Zeit-Verlauf für Taq-Polymerase

Temperatur	Zeit	
95° C	10 min	
95° C	30 sec	35 Zyklen
45-60° C	30 sec	
72° C	1 min/kb	
72° C	10 min	
10° C	∞	

Tabelle 19: Temperatur-Zeit-Verlauf für Phusion-Polymerase

Temperatur	Zeit	
98° C	3 min	
98° C	10 sec	35 x
$T_m + 3° C$	30 sec	
72° C	30 sec/kb	
72° C	10 min	
10° C	∞	

3.9.3 NESTED PCR

Die *nested* PCR, welche auch als verschachtelte PCR bezeichnet wird, bietet die Möglichkeit geringste Mengen an *template* nachzuweisen. Dazu wurde das Produkt aus der ersten PCR 1:100 verdünnt und als *template* für die zweite Amplifikation mit anderen Primern verwendet, welche zwischen dem ersten Primerpaar liegen. Ein weiterer Vorteil war hierbei, dass die falsch amplifizierten Produkte durch Fehlhybridisierungen vernachlässigt wurden.

3.9.4 GRADIENTEN-PCR

Damit die Zielsequenz in ausreichender Menge amplifiziert wird, wurde die optimale Annealingtemperatur für eine PCR bestimmt, welches einen Kompromiss zwischen Spezifität und Effizienz darstellt. Da die Optimierung der PCR einen hohen Zeitfaktor darstellte, wurde die Gradienten-PCR genutzt. Diese wurde mit einem speziellen Thermocycler durchgeführt, welcher in einem Block von Reihe zu Reihe definierte Temperaturdifferenzen ermöglichte und somit die bestmögliche T_A ermittelt werden konnte.

3.9.5 RACE-PCR

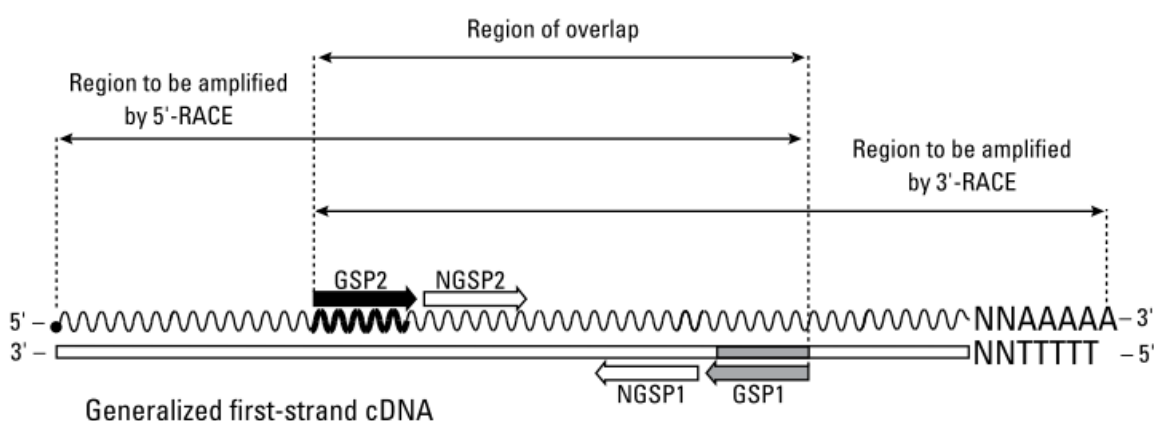


Abbildung 9: Durchführung der RACE mit zwei Primerpaaren (Clontech Laboratories, 2010)

Die Darstellung zeigt eine cDNA mit 5'-und 3'-Ende. Für die RACE werden zwei verschiedene modifizierte cDNAs verwendet, welche mit den Primern GSP und NGSP amplifiziert werden.

Für die Amplifizierung der 5'- und 3'-Enden der mRNA, wurde eine spezielle *reverse transkriptase* PCR angewandt, die RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA ends*), welche auch als *anchored* oder *one-sided* PCR bezeichnet wird (Ohara, 1989). Diese wurde genutzt, um die Region zwischen einer kurzen bekannten Sequenz des cDNA-Moleküls und seiner unbekannten 5'- und 3'-Ende zu vervielfältigen (Frohmann, 1988). Von der bekannten Sequenz ausgehend wurden zwei genspezifische *forward*-Primer (GSP1; NGSP1) für die 3'-RACE-PCR und *reverse*-Primer (GSP2; NGSP2) für 5'-RACE-PCR verwendet (Ohara, 1989), welche eine T_M von über 60°C aufwiesen (Abb. 9). Die Amplifizierung der Enden fand in unterschiedlichen Ansätzen statt, weshalb spezifische RACE-Ready cDNAs für die 5'-RACE- bzw. 3'-RACE-PCR synthetisiert wurden. In der ersten PCR wurden je das außenliegende Primerpaar für die zugehörige RACE-Ready-cDNA verwendet, welches aus dem genspezifischen Primer und dem an das modifizierte Ende bindende Universal-Primer bestand. Der Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen (Tab. 20) und wurde mit dem *touchdown* Programm (Tab. 21) durchgeführt.

Tabelle 20: Reaktionsansatz für RACE

Reagenz	eingesetzte Menge
MiliQ H ₂ O	34,5 µl
10x Advantage 2 PCR Buffer	5 µl
cDNA (100ng/µl)	2,5 µl
dNTPs (10mM)	1 µl
UPM (10mM)	5 µl
GSP1 (10mM)	1 µl
50x Advantage Polymerase Mix	1 µl
	50 µl

Tabelle 21: *touchdown* Programm

Temperatur	Zeit	
94° C	10 min	
94° C	30 sec	5 x
72° C	3 min	
94° C	30 sec	5 x
70° C	30 sec	
72° C	3 min	
94° C	30 sec	25 x
68° C	30 sec	
72° C	3 min	
72° C	10 min	
10° C	∞	

Für die nachfolgende *nested* PCR wurde das innenliegende Primerpaar und der 1:100 verdünnte 1. PCR Ansatz als *template* verwendet (Tab. 22) und im folgenden Temperaturprogramm (Tab. 23) durchgeführt.

Tabelle 22: Reaktionsansatz für *nested* RACE

Reagenz	eingesetzte Menge	
MiliQ H ₂ O	36	µl
10x Advantage 2 PCR Buffer	5	µl
1:100 Verdünnung von 1.PCR	5	µl
dNTPs (10mM)	1	µl
NUP (10mM)	1	µl
GSP2 (10mM)	1	µl
50x Advantage Polymerase Mix	1	µl
	50	µl

Tabelle 23: Temperatur-Zeit-Verlauf für *nested* RACE

Temperatur	Zeit	
94° C	10 min	
94° C	30 sec	} 25 x
68° C	30 sec	
72° C	3 min	
72° C	10 min	
10° C	∞	

Die verwendete Advantage-Polymerase genierte dabei PCR-Produkte mit einer geringen Fehlerrate und einem A-Überhang (Clark, 2005; Mülhardt, 2009; Clontech Laboratories, 2010).

3.10 RT-qPCR

3.10.1 PRINZIP

Die Real-Time PCR ist eine Technologie, welche es ermöglicht die Anzahl der DNA-Kopien zu messen. Sie beruht auf dem herkömmlichen Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion, indem es die Nukleinsäuren vervielfältigt, und ermöglicht die Quantifizierung in Echtzeit, welche mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung während oder am Ende des PCR-Zyklus durchgeführt wird (Holzapfel, 2007). Die verwendete Detektionsstrategie wird mit dem Farbstoff SYBRGreen ausgeführt. Dieser Farbstoff lagert sich in die kleine Furche der dsDNA ein und besitzt die Fähigkeit bei einer Anregungswellenlänge von 497 nm (UV-Licht) sichtbares Licht bei 520 nm zu emittieren (Gavrilenko, 2006). Die Verwendung von SYBRGreen erfordert geringe Kosten und ermöglicht eine hohe Detektionssensitivität, jedoch besitzt es eine geringe Spezifität, da SYBRGreen nicht nur mit der Zielsequenz reagiert, sondern auch mit Primerdimern und unspezifischen PCR-Beiprodukten, welche ein positives Signal emittieren (Holzapfel, 2007). Die Spezifität der Primer kann jedoch durch eine Schmelzpunktanalyse überprüft werden.

Die Intensität des Signals ist proportional zu dem dsDNA-Vorkommen, wodurch die Quantifizierung ermöglicht wird, und wird benutzt, um die Akkumulation der aus der qPCR resultierenden amplifizierten Produkte zu beobachten (SABiosciences, 2008). Ein weiterer Nachteil ist jedoch, dass das Signal abhängig von der Produktlänge ist, da nicht ein Signal je gebildetem Produkt abgegeben wird, sondern je amplifiziertem Molekül. Daher emittieren längere Produkte ein stärkeres Signal als kürzere (VanGuilder, 2008).

3.10.2 ANSATZ

Der Reaktionsansatz für die qPCR erfolgte mit speziellen Pipetten in 96-Well Platten mit je 3 Replikaten pro cDNA-Probe. Je untersuchtes Gen wurde ein Mastermix (Tab. 24), bestehend aus Primerpaar, Reinstwasser und SYBRGreen, angefertigt und auf die *wells* verteilt. Im Anschluss wurden je *wells* 2 µl der gut durchmischten cDNA-Probe pipettiert. Danach wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und für 1 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Als nächstes wurde in dem Ligth Cycler von Roche das Programm „Template Roche 45 Cycles“ ausgewählt, die Platte eingesetzt und gestartet.

Tabelle 24: Reaktionsansatz für RT-qPCR

Reagenz	eingesetzte Menge	
<i>forward</i> Primer (6 µM)	1	µl
<i>reverse</i> Primer (6 µM)	1	µl
H ₂ O Kit	6	µl
SYBRGreen	10	µl
cDNA (50 ng/µl)	2	µl
20 µl		

3.10.3 PRIMEREFFIZIENZ

Die Effizienz der verwendeten Primer wurde durch die Erstellung einer Standardkurve ermittelt. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe in 1:2 aus der cDNA der Probe Hg 1 ppb A* erstellt und in je 2 Replikaten die qPCR durchgeführt. Die ermittelten c_T -Werte der Verdünnungen wurden gegen die logarithmische Konzentration aufgetragen. Die resultierende Standardkurve gab Informationen über die Effizienz, sowie die Genauigkeit und Sensitivität der PCR. Die Primereffizienz wurde aus dem Anstieg der Standardkurve nach Formel 3 berechnet. Bei einem Wert zwischen 1,8 und 2 konnte der erstellte Primer verwendet werden.

$$E = [10^{(-1/\text{Anstieg})}] - 1$$

Formel 3: Berechnung der Primereffizienz aus dem Anstieg der Standardkurve

3.10.4 SCHMELZPUNKTANALYSE

Mit Hilfe der Schmelzpunktanalyse wurde untersucht, ob die Primer neben der gewünschten Effizienz auch die notwendige Spezifität besitzen. Dazu wurde am Ende der PCR der Reaktionsansatz kontinuierlich in 1 °C-Schritten von 55 °C auf 96 °C erhitzt und dabei die Fluoreszenz gemessen. Durch die Temperaturerhöhung wurden die DNA-Fragmente aufgeschmolzen. Bei der Temperatur, bei der die dsDNA denaturiert wurde, wurde ein Abfall der Fluoreszenz gemessen und somit die Schmelztemperatur bestimmt und als Peak

angezeigt. Wenn die gewählten Primer eine hohe Spezifität aufwiesen, trat nur der Peak der Zielsequenz auf (Holzapfel, 2007; Gavrilenko, 2006).

3.10.5 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG

Um eine Aussage über die Expression der untersuchten Gene zueinander und zwischen den verschiedenen Proben treffen zu können, wurde eine relative Quantifizierung der zu detektierenden Nukleinsäure zu dem Referenzgen des ribosomalen Proteins S3 durchgeführt. Dieses wird in allen Zelltypen, Zellzyklen der *Dreissena polymorpha* gleich stark exprimiert und es sind keine Variationen in der Expression durch Stressfaktoren bekannt. Nach der Durchführung der RT-qPCR wurde der Zyklus angegeben, bei dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz anstieg und als c_T -Wert (*cycle threshold* Schwellenwertzyklus) angegeben. Mit diesem Wert und der vorher bestimmten Primereffizienz, könnte die gesamte Nukleinsäurekonzentration in der Probe über eine absolute Quantifizierung und einer externen Standardkurve mit bekannten Konzentrationen nach Formel 4 berechnet werden.

$$\begin{aligned} N &= N_0(1 + E)^{c_T} & N_T &= N_{0,T}(1 + E_T)^{c_{T,T}} \\ N_R &= N_{0,R}(1 + E_R)^{c_{T,R}} \end{aligned}$$

Formel 4: Berechnung der Anzahl der Transkripte in der Probe

Jedoch ist keine externe Standardkurve vorhanden, daher erfolgte die Quantifizierung relativ zu dem Referenzgen nach Formel 5, wodurch die Expression des Ziel/*Target*-Gens durch das Fluoreszenzsignals des Referenzgens normalisiert wurde.

$$\frac{N_0 \text{ Target Gen}}{N_0 \text{ Referenz Gen}} = \frac{N_{0,T}}{N_{0,R}} = \frac{N_T / (1 + E_T)^{c_{T,T}}}{N_R / (1 + E_R)^{c_{T,R}}} = \frac{N_T}{N_R} \cdot \frac{(1 + E_R)^{c_{T,R}}}{(1 + E_T)^{c_{T,T}}} = K \cdot \frac{(1 + E_R)^{c_{T,R}}}{(1 + E_T)^{c_{T,T}}}$$

Formel 5: Normalisierung der Expression des Zielgens durch ein Referenzgen

Diese Berechnung konnte dabei vereinfacht werden, da einerseits die Primer so gewählt wurden, dass deren Effizienz in etwa übereinstimmen, und andererseits nur Primerpaare mit einer Effizienz zwischen 90% und 110% verwendet wurden, wodurch die Kopienzahl und die relative Expression des Zielgens nach Formel 6 berechnet wurde.

Wenn $E_R = E_T$ gilt:

$$\frac{N_{0,T}}{N_{0,R}} = K \cdot (1 + E)^{c_{T,R} - c_{T,T}}$$

Wenn $90\% < E < 110\%$ gilt:

$$\frac{N_{0,T}}{N_{0,R}} = K \cdot (1 + 1)^{c_{T,R} - c_{T,T}} = K \cdot 2^{(c_{T,R} - c_{T,T})} = K \cdot 2^{\Delta c_T} = \text{Kopiezahl}$$

$$\text{Relative Expression eines Gens} = \Delta c_p + \log(1000; 2)$$

Formel 6: vereinfachte Berechnung der relativen Expression und Kopiezahlen des Zielgens

Um einen Vergleich zwischen den Proben und verschiedenen Ziel-Genen treffen zu können, wurden die unterschiedlichen Proben nach Formel 7 ins Verhältnis gesetzt.

$$\frac{\text{Probe 1}}{\text{Probe 2}} = \frac{K \cdot 2^{\Delta c_T, \text{Probe1}}}{K \cdot 2^{\Delta c_T, \text{Probe2}}} = \frac{2^{\Delta c_T, \text{Probe1}}}{2^{\Delta c_T, \text{Probe2}}}$$

Formel 7: Relative Expression zweier Proben zueinander

3.10.6 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Als erstes wurde durch die Berechnung des Mittelwertes und der Standardabweichung der Fehler innerhalb der Replikate und der Behandlung des untersuchten Ziel-Gens ermittelt, wobei nicht bekannt war ob eine Normalverteilung besteht.

Danach wurden die gewonnenen Daten mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 10.0 analysiert, indem die nach Ziel-Gen, Behandlung und Replikat unterschiedenen Werte in das Programm geladen und mit dem Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstest auf Normalverteilung untersucht wurden. Bei einer asymptotischen Signifikanz von >0.05 verhielten sich die Werte normal und es wurde eine einseitige-Anova (*analysis of variance*, Varianzanalyse) mit dem Turkey-Kramer-Test durchgeführt. Bei einem Wert von <0.05 wurde K-Independent-Sample gewählt und der Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, um eine Möglichkeit der Gruppierung der Daten nach dem mittleren Rang zu erhalten.

3.11 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Für die Überprüfung einer erfolgreichen RNA-Isolation die Kontrolle einer PCR bzw. die Auftrennung von PCR-Fragmenten und die Visualisierung des Restriktionsverdaus wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Zur Herstellung eines 1%igen Agarosegels für die Elektrophorese, wurden für eine kleines 30 ml Gel 0,3 mg Agarose abgewogen, mit dem entsprechendem Volumen 30 ml TAE (1x) vermengt und in einer Mikrowelle in kurzen Zeitintervallen gelöst und dabei immer wieder geschwenkt, um einen Siedeverzug zu vermeiden. Nach der vollständigen Auflösung der Agarose wurde der Erlmeyerkolben mit der Agarose-Lösung unter fließendem Wasser kurz abgekühlt und 1 µl des interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid auf 100 ml Agarose-Lösung gegeben, durchmischt und in eine Form gegossen. Danach wurde ein Kamm für die Taschen in das Gel eingesetzt und das Gel für ca. 20 min ausgehärtet. Anschließend wurde das Gel in eine mit TAE (1x) gefüllte Elektrophorese-Kammer eingesetzt und der Kamm entfernt, so dass das TAE vollständig das Gel bedeckte. Die zu untersuchenden Proben mussten vor der Beladung vorbereitet werden, indem 1 µl des Lade-Puffer Orange in 5 µl Probe gegeben und gevortext wurde. Durch

diesen Ladepuffer konnte die Probe bei Zugabe in die Kammer absinken. Außerdem wurden die Geschwindigkeit und die Richtung der wandernden Nukleotide angezeigt. Neben der Probe wurde ein Marker mit Strängen bekannter Größe in eine zusätzliche Kammer pipettiert, um einen Vergleich der zu untersuchenden Probe zu ermöglichen. Danach wurde ein elektrisches Feld zwischen 80-120V für ca. 20 min angelegt, um eine Trennung nach der Größe der Nukleotid-Fragmente zu ermöglichen, da die negativ geladenen Nukleotide angezogen werden und die kleineren Moleküle sich jedoch schneller durch das Gel bewegen als die größeren. Nach erfolgter Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet.

3.12 DNA-EXTRAKTION

Die Extraktion der amplifizierten DNA-Fragmente aus dem PCR-Ansatz erfolgte über Reinigungs-Säulchen (Fermentas). Dazu wurde im Verhältnis 1:1 (Volumen:Volumen) Binding-Puffer zu dem PCR-Ansatz zugegeben, gevortext und der Ansatz auf die integrierte Membran der Säule pipettiert, an welcher die DNA bindete. Entsprechend der Anleitung von Fermentas wurden durch eine anschließende Zentrifugation und die Zugabe von Wash-Puffer die restlichen Salze und Nukleotide entfernt. Danach wurde die DNA mit Hilfe von Elutions-Puffer von der Membran gelöst und in einem Eppendorf-Röhrchen konzentriert.

Bei einer unspezifischen PCR wurde der PCR-Ansatz zuerst auf ein Gel aufgetragen und die PCR-Fragmente der Größe nach aufgetrennt. Danach wurde das Gel nur bei einer Intensität von 70% unter UV-Licht betrachtet, um Strangbrüche innerhalb der Fragmente zu vermeiden. Dabei wurde die gesuchte Bande mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten, in ein Eppendorf-Röhrchen gegeben und anschließend gewogen. Die Extraktion von DNA aus einem Gel erfolgte auch über Röhrchen (Fermentas). Jedoch musste zuvor 1:1 (Volumen μl : Gewicht mg) Binding-Puffer zu der ausgeschnittenen Bande gegeben werden und dies für 10 min bei 50-60°C in einem Thermomixer gelöst werden. Die darauffolgenden Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

3.13 Klonierung von DNA – Fragmenten

Der Grund und die Zielstellung für die Übertragung von Fremd-DNA in Zellen, ist die Vermehrung dieser DNA, indem sich die rekombinanten DNA-Moleküle mit den sich teilenden Zellen identisch vermehren. Weiterhin kann die DNA einfach aus der Zelle isoliert werden, wodurch man die gewünschten DNA-Moleküle in großen Mengen gewinnen kann (Bielka, 1995).

3.13.1 Ligation von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Fragmente wurden durch die Ligation in linearisierte Plasmid-Vektoren ohne Expressionsfunktion eingebaut, welche definierte Schnittstellen für

Restriktionsendonukleasen und Selektionsmerkmale, wie Antibiotikaresistenzen, enthielten. Es wurden Vektoren für *sticky* und *blunt end*-Ligation verwendet. Polymerasen mit Taq-Enzym (GoTaq, Advantage 2) amplifizieren PCR-Fragmente mit A-Überhang am 3'-Ende (*sticky ends*), während mit Phusion-Polymerase PCR-Fragmente ohne Überhang (*blunt ends*) entstehen.

Für die PCR-Fragmente mit *sticky ends* wurde der linearisierte Plasmid Vektor pCR 2.1 mit generierten T-Überhängen am 3'-Ende verwendet. Für den Reaktionsansatz (Tab. 25) wurde die Menge an benötigtem PCR-Produkt für das Verhältnis 1:1 (Vektor:PCR-Produkt) nach Formel 8 berechnet. Danach wurde der Reaktionsansatz für 10 Std. bei 14°C inkubiert, wobei die Ligase die Basen A und T miteinander verknüpfte (Abb. 10). (Invitrogen, 2004)

$$x_{ng} \text{ PCR-Produkt} = \frac{(Y \text{ bp PCR Produkt}) \cdot (50 \text{ ng pCR 2.1 Vektor})}{(\text{Größe in bp des pCR 2.1 Vektors} \sim 3900)}$$

Formel 8: Berechnung der benötigten Menge an frischem PCR-Produkt

Tabelle 25: Reaktionsansatz für die Ligation mit pCR 2.1

Reagenz	eingesetzte Menge	
frisches PCR-Produkt	x	µl
10x Ligations-Buffer	1	µl
pCR 2.1 Vektor (25 ng/µl)	2	µl
Wasser	9 - x	µl
T4 DNA Ligase (4 U)	1	µl
	10	µl

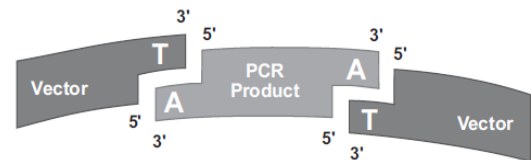


Abbildung 10: pCR 2.1 Vektor (Invitrogen, 2004)

Prinzip der Ligation von PCR-Produkten mit *sticky ends* mit der T4 Ligase

PCR-Fragmente mit *blunt ends* wurden durch eine Inkubation für 20 min bei 72°C mit Taq Polymerase und dNTPs mit einem A-Überhang versehen und dann in einen *sticky end*-Vektor ligiert. Außerdem wurde der pCR II-Blunt-Topo Vektor für die *blunt end*-Ligierung verwendet. Dieser besitzt an den 3'-Enden kovalent gebundene Topoisomerasen, welche das PCR-Produkt und den Vektor über eine Phosphodiesterbindung ohne die Verwendung von Ligase fest miteinander verknüpfte (Abb. 11). Der Reaktionsansatz (Tab. 26) wurde in Abhängigkeit von der Fragmentgröße für 30 sek–30 min bei Raumtemperatur inkubiert (Invitrogen, 2006).

Tabelle 26: Reaktionsansatz für die Ligation mit pCR II-Blunt-Topo

Reagenz	eingesetzte Menge	
frisches PCR-Produkt	3	µl
Salzlösung	1	µl
pCR II Blunt Topo Vektor	2	µl
Wasser	1	µl
	6	µl

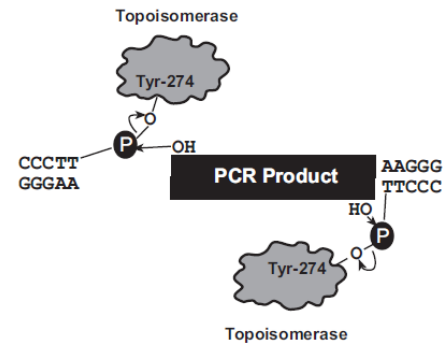


Abbildung 11: pCR II-Blunt-Topo Vektor (Invitrogen, 2006)

Die Verbindung des Vektors mit dem PCR-Produkt erfolgt über Topoisomerasen des *Vaccinia-Virus*

Es wurde außerdem ein weiterer *blunt end* Vektor pJET 1.2 benutzt, welcher die gleiche Inkubationszeit und Temperatur wie pCR II-Blunt-TOPO Vektor benötigt, jedoch die Zugabe von T4-DNA-Ligase benötigt (Tab. 27).

Tabelle 27: Reaktionsansatz für die Ligation mit pJET 1.2

Reagenz	eingesetzte Menge	
frisches PCR-Produkt	2	µl
2x Reaction-Buffer	2	µl
pJET 1.2 Vektor (50 ng/µl)	1	µl
Wasser	6	µl
T4 DNA Ligase (4 U)	1	µl
	20	µl

3.13.2 HITZESCHOCK-TRANSFORMATION DER DNA-FRAGMENTE IN *E. COLI*

Die Vektoren mit dem Ziel-DNA wurden über einen Hitzeschock in die chemisch kompetenten Zellen überführt. Dazu wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl chemisch kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und für 30 min auf Eis gelagert. Durch einen anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 30 s konnten die Zellen die frei im Medium vorhandene DNA aufnehmen. Danach wurde 150 µl SOC-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben und für 1 Std. bei 37°C geschüttelt, um die Zellen zu aktivieren. Als nächstes wurde der Transformationsansatz auf Antibiotika behandelten LB-Platten ausgestrichen, um nur Zellen mit dem Vektor zu erhalten. Das verwendete Antibiotikum hing dabei von dem verwendeten Vektor ab. Der pCR II-Blunt-TOPO-Vektor besitzt nur ein Kanamycin-Resistenz-Gen und der pJET 1.2 ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Der Vektor pCR 2.1 vermittelt sowohl Ampicillin- als auch Kanamycin-Resistenz, sowie das lacZ-Gen für den Abbau von X-Gal. Daher wurde vorher 40 µl X-Gal je Platte ausgestrichen. Die Platten wurden für 12 Std. bei 37°C inkubiert.

3.13.3 BLAU/WEIß-SELEKTION + KOLONIE-PCR ZUR KONTROLLE DER INSERierten PRODUKTE

Durch den Selektionsmarker Antibiotikaresistenz konnten nur die Zellen wachsen, welche den Vektor durch die Hitzeschocktransformation aufgenommen hatten. Der Vektor pCR 2.1 enthält dazu einen zweiten Selektionsmarker, die Blau-Weiss-Selektion durch das lacZ-Gen. Dadurch wurden die Kolonien mit Zellen kenntlich gemacht, welche einen Vektor mit einem Insert aufgenommen hatten. Die Zellen, welche eine Vektor ohne eingebauten PCR-Fragment enthielten, waren blau gefärbt, da sie durch das lacZ-Gen das Enzym β -Galaktosidase exprimieren und somit das X-Gal als Substrat nutzen konnten, wodurch ein blauer Indigofarbstoff entstand. Es waren nur die weißen Zellen von Bedeutung, da das PCR-Fragment innerhalb des lacZ-Gens eingebaut wurde und somit dieses seine Wirkung verliert und X-Gal nicht abgebaut werden konnte.

Tabelle 28: Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR

Reagenz	eingesetzte Menge	
Finnzym Puffer	2,5	μ l
dNTPs Mix(10mM)	0,5	μ l
GoTaq DNA Polymerase (5U/ μ l)	0,12	μ l
H ₂ O	18,88	μ l
<i>forward</i> Primer	1,5	μ l
<i>reverse</i> Primer	1,5	
	10	μ l

Jedoch konnte dabei nicht festgestellt werden, ob das gesuchte PCR-Fragment eingebaut wurde. Außerdem besitzen die Vektoren pCR II-Blunt-TOPO und pJET 1.2 keinen zweiten Selektionsfaktor. Daher wurde als Kontrolle eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde eine Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt, auf eine neue Platte gedrückt und in den Reaktionsansatz (Tab. 28) gegeben. Die verwendeten Primerpaare (16, 17) waren dabei vektorspezifisch. Es wurde das gleiche Programm in Abhängigkeit der Größe des gesuchten Fragmentes, wie für eine normale PCR mit der Taq-Polymerase durchgeführt. Nach dem Auftragen auf ein Gel musste berücksichtigt werden, dass die Bande circa 100-200 bp größer ist, da ein Teil des Vektors mit amplifiziert wurde.

3.13.4 PLASMIDANREICHERUNG + EXTRAKTION

Für die Gewinnung einer großen Menge des Plasmides, wurde eine Mini-Präparation angesetzt. Dazu wurde resultierend aus der Kolonie-PCR die Kolonie gepickt, welche das gesuchte PCR-Fragment enthält, und in Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium und, je nach Antibiotika-Resistenz, Ampicillin (100 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l) gegeben. Diese Flüssig-Kultur wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und durch Schütteln gut durchmischt.

Die Kultur wurde anschließend in 2 ml-Röhrchen gegeben und zentrifugiert. Dadurch konnten sich die Zellen am Boden ablagern und das überschüssige Medium wurde verworfen. Die Extraktion der Plasmide aus den *E.coli*-Zellen erfolgte im ersten Schritt durch die Auflösung der Zellwände mit Hilfe eines Lyse-Puffers des Plasmid Miniprep Kits von Fermentas. Danach wurde durch die Zugabe eines Neutralisations-Puffers und der darauffolgenden Zentrifugation eine Trennung der Lösung mit den Plasmiden von den abgesetzten Zelltrümmern und Proteinen erreicht. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte über Säulchen durch Wasch-Puffer und die Konzentrierung in Elutions-Puffer.

3.14 RESTRIKTIONSVERDAU ZUR ÜBERPRÜFUNG DER PCR-FRAGMENTE

Es wurde eine weitere Möglichkeit der Überprüfung genutzt, um zu kontrollieren, ob die Plasmide die gewünschten PCR-Fragmente enthalten. Dazu wurden vektorspezifischen Restriktionsschnittstellen auf beiden Seiten des eingebauten PCR-Fragmentes genutzt (Tab. 29+30). Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen für 50 min bei 37°C inkubiert und dabei verdaut. Bei einer anschließenden Gelelektrophorese sollten zwei Banden sichtbar sein, der Vektor und das PCR-Fragment.

Tabelle 29: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau von pCR 2.1- und pCR II Blunt-TOPO-Vektor

Reagenz	eingesetzte Menge	
Plasmid Probe	2	µl
Eco R1	0,2	µl
Eco R Puffer	1	µl
Wasser	6,8	µl
	10	µl

Tabelle 30: Reaktionsansatz für Restriktionsverdau von pJET 1.2-Vektor

Reagenz	eingesetzte Menge	
Plasmid Probe	1	µl
BG III	0,5	µl
Puffer O	1	µl
Wasser	7,5	µl
	10	µl

3.15 SEQUENZIERUNG NACH SANGER

Die Sequenzierung erfolgte nach der Strang-Abbruch-Methode mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten ddNTPs nach Sanger. Dazu wird eine PCR mit einem vektor- oder genspezifischen Primer und dem zu sequenzierenden Plasmid in der Konzentration von 100-150 ng/µl in 0,2 ml Röhrchen durchgeführt (Tab. 31+32).

Tabelle 31: Reaktionsansatz für Sequenzierung

Reagenz	eingesetzte Menge	
Big Dye Puffer 1.1	1	µl
Big Dye 1.1	1	µl
Primer (<i>forward/reverse</i>)	1	µl
Plasmid (100-150 ng/µl)	x	µl
Wasser (HPLC)	7-x	µl
	10	µl

Tabelle 32: Temperatur-Zeit-Verlauf für Sequenzierung

Temperatur	Zeit	29 Zyklen
96° C	1 min	
96° C	10 sec	
50° C	5 sec	
60° C	4 min	
4° C	∞	

Anschließend wurden die verschieden großen DNA-Stränge durch eine Ethanol-Fällung erhalten und gereinigt. Dazu wurde 2,5 µl EDTA (125 mmol) und 30 µl Ethanol (99,9%) bei Raumtemperatur zugegeben und durch leichtes streichen auf einem Untergrund vermischt. Danach wurde der Ansatz für 15 min im Dunklen bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 45 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Durch ein folgendes kurzes Zentrifugieren der geöffneten Röhrchen, auf dem Kopf, bis 1200 rpm wurde das Ethanol entfernt. Danach wurden 60 µl Ethanol (70%) zugegeben und erneut bei 4000 rpm bei 4°C für 20 min geschlossen zentrifugiert. Der Auf-dem-Kopf Zentrifugations-Schritt wurde erneut für 1 min durchgeführt und die Röhrchen hinterher für 30 min geöffnet ins Dunkle gestellt, um die Ethanol-Reste verdampfen zu lassen. Diese wurde verschlossen und mit Alufolie lichtgeschützt verpackt und in das Department Umweltmikrobiologie mit dem Sequenziergerät ABI gebracht. Dort werden die aufgereinigten DNA-Fragmente mit Hilfe eines Gels aufgetrennt. Das Gerät regt dieses mit einem Laser an und misst die unterschiedlichen Fluoreszenzen, welches in Form eines vierfarbigen Chromatogrammes zurück gesendet wurde.

4 ERGEBNISSE

Das folgende Kapitel ist in vier Abschnitte untergliedert, wobei mit den Analysen und Vergleichen der gewonnenen Gen-Sequenzen begonnen wird. Dazu werden die Ergebnisse der verschiedenen Ansätze zum Erlangen der vollständigen ORF-Sequenz der Gene ABCB von *M. edulis*, *M. trossulus* und *D. polymorpha* sowie ABCC für *M. trossulus* und *D. polymorpha* aufgezeigt. Daran anschließend werden die gewonnenen Ergebnisse und die zugehörigen Analyse-Methoden dargestellt. Im nachfolgenden Abschnitt werden die Resultate aus dem durchgeführten Toxizitätstest mit den Larven von *Dreissena polymorpha* demonstriert und im Anschluss die Etappen zur Durchführung einer RT-qPCR visualisiert und die erhaltenen relativen Expressionen statistisch ausgewertet.

4.1. ERHALTUNG DER UNBEKANNTEN SEQUENZEN ABCB UND ABCC

Der Ausgangspunkt für die Gewinnung von ABCB- und ABCC-Homologen waren bereits vollständig bekannte cDNA-Sequenzen von *M. californianus* und *M. galloprovincialis*. Diese dienten als Vorlagen zur Erstellung von Primern, welche genutzt wurden, um die entsprechenden Sequenzabschnitte von *M. edulis*, *M. trossulus* und *D. polymorpha* zu erhalten.

4.1.1 AMPLIFIZIERUNG UND KOLONIERUNG VON ABCB

Mit Hilfe von diesen Primern (Anhang 5) konnten kurze PCR-Produkte von 400-600bp für *M. edulis*, *M. trossulus* und *D. polymorpha* mit der Taq-Polymerase amplifiziert werden (Abb. 12). Nicht mit jedem Primerpaar wurde ein PCR-Produkt erhalten. Nur PCR-Produkte der am weitesten voneinander entfernten Sequenzenabschnitte (also je das nächste zum 3'- bzw. 5'-Ende) wurden kloniert und sequenziert.

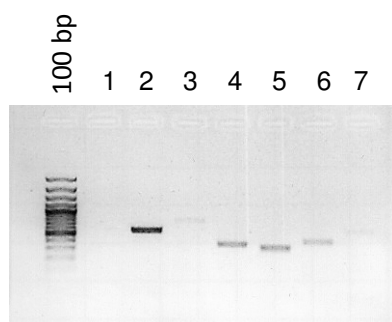


Abbildung 12: Darstellung PCR-Produkte durch ein Gel von ABCB in *M. edulis*

Es wurden die amplifizierten PCR-Fragmente von dem Primerpaar 2 und 7 kloniert und sequenziert.

Diese nun bekannten Sequenzen dienten als Matrizen für die Erstellung genspezifischer Primer für die Durchführung einer RACE-PCR zur Amplifizierung der cDNA-Enden sowie die Erhaltung der Sequenz zwischen den bekannten Sequenzen mit der Phusion-Polymerase. Bei der Durchführung der RACE- und Phusion-PCR entstanden meistens mehrere Banden,

welches darauf hinweist, dass die Primer (24-27) mit geringer Spezifität gebunden haben und eine Amplifikation unterschiedlicher cDNAs stattfand. Daher wurden alle Banden kloniert und ansequenziert, um zu ermitteln, welche Bande das gewünschte PCR-Produkt enthält (Abb. 14).

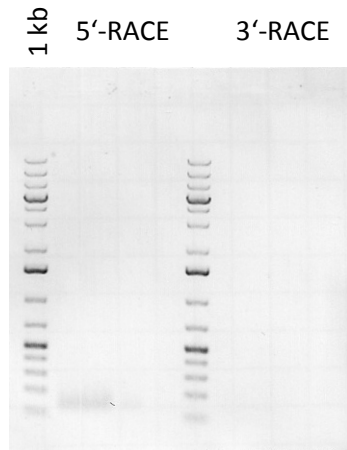


Abbildung 13: erste RACE-PCR mit *M. edulis*

Nach der ersten PCR wurden keine Banden durch die Auftragung auf ein Gel sichtbar. Erst nach der *nested* PCR wurden mehrere Banden sichtbar.

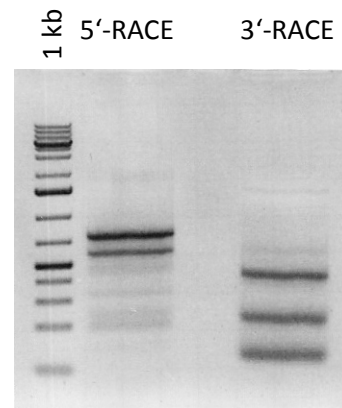


Abbildung 14: *nested* RACE-PCR mit *M. edulis*

In keinem Fall war nach der ersten RACE-Reaktion eine Bande im Gel erkennbar (Abb. 13). Bei einer zweiten RACE (*nested* RACE) wurden PCR-Banden sichtbar (Abb. 14).

Für *M. edulis* und *M. trossulus* konnten Teile des 5'- und 3'- Endes amplifiziert werden. Die zusammengesetzten einzelnen Sequenzabschnitte ergeben Sequenzen mit der Größe von 3841bp für *M. edulis*, 3895bp für *M. trossulus* und 3505 bp für *D. polymorpha*. Mit anhand dieser Sequenzen erstellten Primern (18-21) wurden PCR-Produkte in der erwarteten Größe für *M. edulis* und *M. trossulus* amplifiziert (Abb. 15), konnten jedoch nicht kloniert werden.

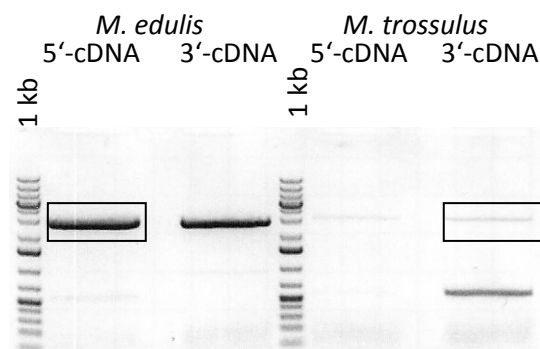


Abbildung 15: Amplifizierung des gesamten ORF von ABCB von *M. edulis* und *M. trossulus*

Die PCR mit der Phusion-Polymerase zur Amplifizierung des gesamten ORF ergab mehrere unspezifische Banden. Die gekennzeichneten Banden wurden ausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert.

Bei der Überprüfung der Sequenzen mit der Blast-Funktion in der Datenbank NCBI wurde festgestellt, dass die amplifizierte ABCB-Sequenz von *D. polymorpha* eine Identität von 91-

98% mit der Gattung *Mytilus* aufweist, also nahezu identisch ist, was nahelegt, dass nicht eine *Dreissena*-Sequenz, sondern in der Tat eine *Mytilus*-Sequenz amplifiziert worden war. Dies wurde auch dadurch bestätigt, dass die erhaltene Sequenz nicht kompatibel mit der bereits bekannten Sequenz von partiellem *Dreissena*-ABCB war (nach Minier und Tutundjan, 2008). Daher wurde davon ausgegangen, dass diese Sequenz vermutlich aus einer Kontamination mit in dem Labor bearbeiteten *Mytilus*-Arten entstand. Aufgrund dessen wurde eine neue RACE-PCR ausgehend von der bekannten Sequenz durchgeführt und eine Sequenz mit einer Länge von 660 bp erhalten (Primer 30,31).

4.1.2 AMPLIFIZIERUNG UND KLONIERUNG VON ABCC

Die Vorgehensweise bei der Amplifizierung und Klonierung von ABCC entsprach der Gleichen, wie für die Ermittlung von ABCB-Homologen. Es wurde ausgehend von sequenzierten Gen-Abschnitten (Abb. 16) eine RACE durchgeführt und die 5'- und 3'- Enden amplifiziert (Abb. 17).

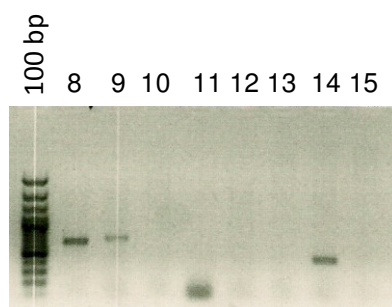


Abbildung 16: Darstellung von PCR-Produkte durch Gel von ABCC in *M. trossulus*

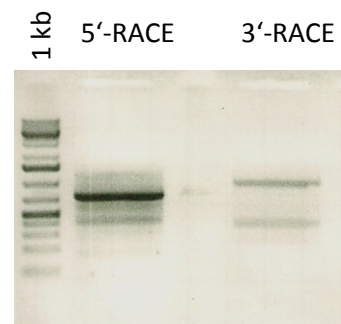


Abbildung 17: Bande nach *nested* RACE-PCR von ein ABCC von *M. trossulus* mit dem Primerpaar 28 & 29

Es wurden die amplifizierten PCR-Fragmente durch die Primerpaare 8 und 14 kloniert und sequenziert. Jedoch konnte durch die RT-PCR nur eine sehr schwache Bande für den gesamten Genabschnitt amplifiziert werden. Dies konnte durch die Veränderung der Annealingtemperatur mit Hilfe einer Gradienten-PCR nicht geändert werden, wodurch das PCR-Fragment nicht kloniert werden konnte.

Als Vorlage für die Ermittlung der ABCC-Sequenz für die *D. polymorpha* diente eine nicht veröffentlichte 110 bp cDNA-Sequenz der Larve einer *D. polymorpha*. Diese wurde durch eine RACE-PCR auf 1157 bp erweitert, welches als Vorlage für die Primererstellung für RT-qPCR diente (Primer 32, 33).

4.2. DIE DARSTELLUNG DER ERGEBNISSE UND DIE PHYLOGENETISCHE ANALYSE VON ABC-TRANSPORTERN VERSCHIEDENER *MYTILUS*-ARTEN

Die amplifizierten Sequenzteile der Transporterproteine wurden in dem Programm Sequencher mit Vorlage einer vollständigen cDNA-Sequenz von *M. californianus* oder *M. galloprovincialis* zu einem „Contig“ zusammengefasst, in dem sich die Teilsequenzen überlappen. Die aus der Konsensussequenz abgeleitete Aminosäuresequenz umfasste für *M. trossulus* ABCB 1295 Aminosäuren, für ABCC 1118 Aminosäuren und für *M. edulis* ABCB 1261 Aminosäuren. Die Analyse mit Prosite zeigte, dass die Sequenzen den typischen Aufbau eines ABC-Transporters haben. Transmembrandomänen sind an den Positionen 57 – 366 und 737 – 1019 und die Nukleotidbindungsstellen wurden an den Positionen 401 – 637 und 1054 – 1291 von *M. trossulus* ABCB festgestellt. ABCB von *M. edulis* besitzt an den Positionen 25 – 335 und 706 – 987 Transmembrandomänen und an den Positionen 370 – 606 und 1022 – 1256 Nukleotidbindungsstellen. In ABCC von *M. trossulus* wurden zwei Transmembrandomänen an den Positionen 300 – 444 und 612 – 841 sowie eine Nukleotidbindungsstelle an der Position 878 – 1112 gefunden. In der übersetzten Aminosäuresequenz aus der Konsensussequenz konnten Kennzeichnung von typischen strukturellen Merkmalen und spezifische Sequenzmotive charakterisiert und daher nachgewiesen werden, dass es sich um ABC-Transporter handelt. Eine phylogenetische Analyse von ABCB und ABCC der *Mytilus*-Arten *M. californianus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis* und *M. trossulus* auf Nukleinsäureebene ergibt starke Ähnlichkeiten zwischen den *Mytilus*-Arten. Es wurde kein phylogenetischer Vergleich auf Aminosäureebene durchgeführt, da keine vollständige ORF-Sequenzen mit der Phusion-Polymerase amplifiziert, kloniert werden konnte und daher eine fehlerhafte Sequenz mit Stoppcodonen vorliegt.

4.2.1 ERGEBNISDARSTELLUNG DER ERMITTELTEN SEQUENZEN

Die Konsensussequenz wurde gebildet, indem bei verschiedenen Basen jene gewählt wurde, welche am wenigsten von einer gegebenen Menge an Basen abweicht (Abb. 18a). Ist jedoch die gleiche Anzahl an verschiedenen Basen vorhanden, wird dieses als Polymorphismus bezeichnet (Abb. 18b), welcher durch die hohe Fehlerrate während der PCR entstehen kann oder innerhalb der DNA des Organismus vorliegt. Die Wahl der Base wurde dabei von der Qualität durch das Chromatogramm getroffen (Abb. 18c).

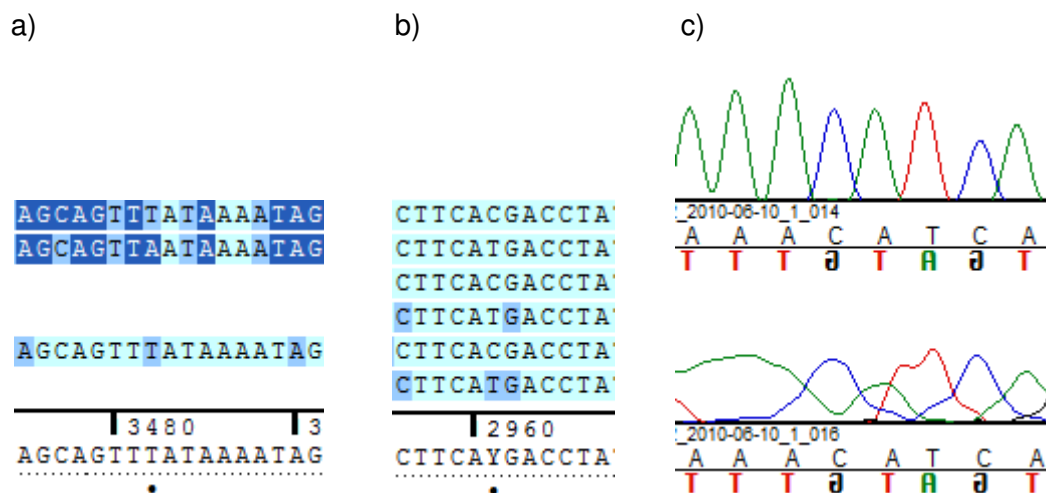


Abbildung 18: Darstellung der ermittelten Sequenzen in Sequencher

Die a) Ermittlung der Konsensussequenz und Aufklärung von b) Polymorphismen mit Hilfe der c) Chromatogramme.

In der vorliegenden Konsensussequenz wurde versucht beginnend bei einem Startcodon bis zum Stoppcodon den offenen Leserahmen (ORF) zu bestimmen (Abb. 19). Jedoch stellte sich bei einem Abgleich mit *M. californianus* und *M. galloprovincialis* heraus, dass für *M. edulis* ein Teil des 5'-Endes der cDNA zur Erhaltung des vollständigen ORF für ABCB fehlte. Außerdem befand sich innerhalb der cDNA-Sequenz des ABCB-Gens von *M. edulis* und *M. trossulus* ein Stoppcodon an der Position 1599.

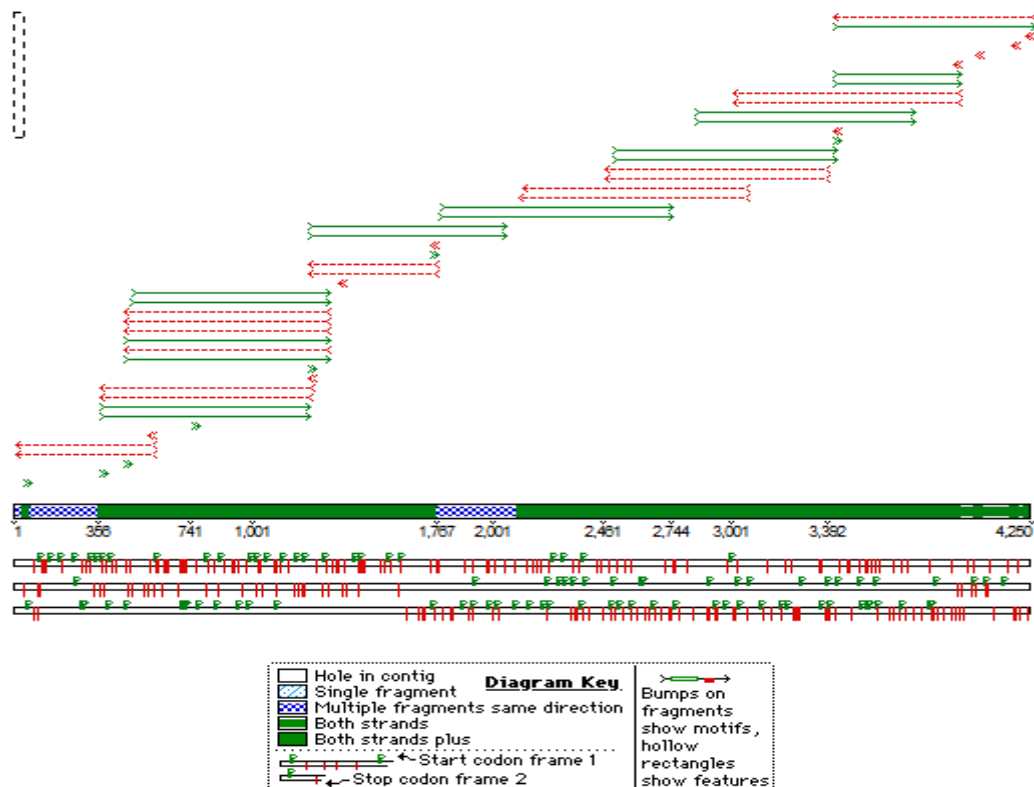
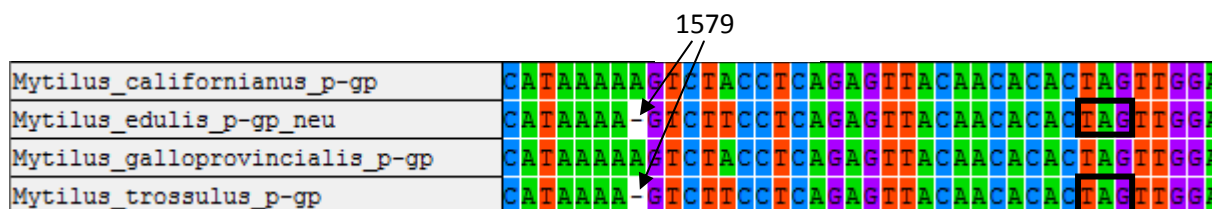


Abbildung 19: Darstellung des „Contig“ von *M. edulis* ABCB

Das „Contig“ entsteht durch überlappende Sequenzteile. Im unteren Bereich werden die verschiedenen Leserahmen dargestellt, welches erkennen lässt, dass sich ein Stoppcodon innerhalb des ORF befindet und einen *frameshift* bewirkt.

Durch einen Abgleich der Konsensussequenzen bei den untersuchten *Mytilus*-Arten mit den vollständigen cDNA-Sequenzen von *M. californianus* und *M. galloprovincialis* wurde eine fehlende Adenosinbase an der Position 1579 festgestellt. Diese Deletion erzeugt einen *frameshift* in der cDNA-Sequenz von ABCB in *M. edulis* und *M. trossulus*, wodurch das Leseraster, hinter der Punktmutation folgenden Basentriplets, verschoben wird (Abb. 20).



	1579
<i>Mytilus_californianus_p-gp</i>	CATAAAAAAGTCTACCTCAGAGTTACAAACACACTAGTGTGGA
<i>Mytilus_edulis_p-gp_neu</i>	CATAAAAA-GTCTTCCTCAGAGTTACAAACACACTAGTGTGGA
<i>Mytilus_galloprovincialis_p-gp</i>	CATAAAAAAGTCTACCTCAGAGTTACAAACACACTAGTGTGGA
<i>Mytilus_trossulus_p-gp</i>	CATAAAAA-GTCTTCCTCAGAGTTACAAACACACTAGTGTGGA

Abbildung 20: Punktmutation

An der Stelle 1579 tritt eine Punktmutation in Form einer fehlenden Adenin-Base auf, wodurch in dem nachfolgenden verschobenen Leseraster das umrandete Stoppcodon abgelesen wird.

Diese Punktmutation wurde durch Einfügen einer zusätzlichen Adeninbase an der Position 1579 in Sequencher aufgehoben. Die entstehende Sequenz enthielt kein Stoppcodon mehr und es wurde für *M. trossulus* der vollständige ORF mit 3895 bp und für *M. edulis* der unvollständige ORF mit 3841 bp für ABCB erhalten, welcher für die folgenden Analysen genutzt wurde. Es konnte ebenfalls nur ein Teil des ORF mit 3407 bp für ABCC von *M. trossulus* bestimmt werden.

4.2.2 NACHWEIS STRUKTURELLER MERKMALE DER TRANSPORTPROTEINE AUF AMINOSÄUREEBENE

Als Nachweis, dass es sich bei den untersuchten cDNA-Sequenzen von *M. edulis*, *M. trossulus* und *Dreissena polymorpha* wirklich um die ABCB- und ABCC-Homologe handelt, wurden die Nukleinsäuresequenzen mit Mega 4 in Aminosäuresequenzen umgeschrieben und mit Hilfe von Prosite und dem Polyphobius-Algorithmus charakteristische ABC-Transporter-Merkmale nachgewiesen. Da für *M. edulis* jedoch der beginnende Teil mit dem Startcodon des ORF fehlte, wurde zuvor eine Abgleich der cDNA-Sequenz von *M. trossulus* gemacht, um den richtigen Leseraster für die Umsetzung zu bestimmen.

Die ermittelten Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm Prosite auf ABC-Transporterspezifische Strukturen untersucht. Dieses ergab für ABCB beider untersuchter *Mytilus*-Arten eine Unterteilung in zwei funktionelle Untereinheiten, je eine bestehend aus einer Transmembrandomäne (TMD) sowie einer Nukleotidbindungsdomäne (NBD), welche weitere hochkonservierte Sequenz-Merkmale, wie *A-loop*, Walker A, ABC-Signatursequenz und Walker B enthält (Abb. 23). Für die Aminosäuresequenz von ABCC von *M. trossulus* wurden zwei Transmembrandomänen und auf Grund der unvollständigen Sequenz nur die zweite Nukleotidbindungsdomäne mit seinen charakteristischen Merkmalen identifiziert (Abb. 24). Durch den Polyphobius-Algorithmus wurden für ABCB von *M. edulis* und *M. trossulus*

zwölf Transmembranhelices (TM) identifiziert, welche mit je 6 TM zwei TMD entsprechen und mit der Struktur TMD₁-NBD₁-TMD₂-NBD₂ einem *full transporter* entsprechen (Abb. 23). Außerdem wurde festgestellt, dass sich der NH₂-Terminus auf der intrazellulären Seite befindet, welches typisch für ABCB-Transporter ist. Für ABCC der *M. trossulus* wurden 15 Transmembranhelices erkannt (Abb. 24). Eigentlich besitzt der ABCC-Transporter 17 TM, da er eine zusätzliche TMD₀ im NH₂-terminalen Ende aufweist, welche durch Prosite nicht erkannt wurden. Jedoch fehlen 2 TM, da die bekannte cDNA-Sequenz im Kodieren der TMD₁ abbricht. Außerdem wurde erkannt, dass sich der NH₂-Terminus extrazellulär befindet, welches charakteristisch für „lange“ ABCC-Transporter ist.

Weiterhin wurden N-Glykolysierungsstellen (GS) in ABCB- und ABCC-Homologen festgestellt, welche die Stabilität der Proteine beeinflussen (Bard, 2000). Die GS wird durch die Aminosäuresequenz N(Asparagin)-*-T(Threonin)/S(Serin) gekennzeichnet und wird auch als Sequon bezeichnet. Dabei kann * eine beliebige AS außer Prolin sein. In den ABCB-Proteinen befinden sich drei N-Glykolysierungsstellen in der ersten Transmembrandomäne zwischen den beiden ersten Transmembranhelices. Dabei unterscheidet sich die dritte GS mit NAT von *M. trossulus*, *M. edulis* von der NVT von *M. californianus*, *M. galloprovincialis*. Die Sequons befinden sich für *M. trossulus* dabei an den Positionen N⁸⁹-G⁹⁰-S⁹¹, N⁹⁸-A⁹⁹-T¹⁰⁰, N¹⁰⁴-V¹⁰⁵-T¹⁰⁶ und für *M. edulis* an N⁵⁷-G⁵⁸-S⁵⁹, N⁶⁶-A⁶⁷-T⁶⁸, N⁷²-V⁷³-T⁷⁴ (Abb. 23).

In den ABCC-Proteinen wurde in dem extrazellulären NH₂-Terminus eine N-Glykolysierungsstelle N⁴-L⁵-S⁶ in allen untersuchten *Mytilus*-Arten, außer *M. californianus* festgestellt. Die beiden weiteren GS wurden in der TMD₂ zwischen den ersten beiden TM ausfindig gemacht, wobei *M. trossulus* die erste GS nicht aufweist. Die zweite GS befindet sich an der Position N⁶⁰⁷-E⁶⁰⁸-T⁶⁰⁹, außerdem ist bei *M. galloprovincialis* die Aminosäure E durch ein G ausgetauscht (Abb. 24).

Für ABCB und ABCC der *Dreissena polymorpha* wurde die ABC-Signatur nachgewiesen (Abb. 21+22). Daher konnten die ermittelten cDNA-Sequenzen als Primervorlage für die RT-qPCR genutzt werden.

QILIDGVNLKDINLKWRENIGIVSQEPVLFGTTEEENIRYGHLDVTKEDIEQAAMANAHDIFIMDLPQKYETLV
GERGAQLSGGQKQRIAIARALVRNPKILLDEATSALDTESEGIVQDALEKASHGRTTIVIAHRLSTIKTADMIA
GFKDGVVAEQGTHTELMSKHGIYQQLVTQSMKSADDDDIENFNRDDTKRPSLNHQKS

Abbildung 21: Aminosäuresequenz von *D. polymorpha* ABCB

TEIGEGKGINLSGGQKQRVSLARAVYNNADVYLDDPLSAVDSHVGKHI

Abbildung 22: Aminosäuresequenz von *D. polymorpha* ABCC

Durch das Programm Prosite wurde die NBD2 (gelb) mit der ABC signature (rosa) identifiziert.

MT_pgp	1295	MSKSEERKFLADD--EQESYTGSSKKDKKEIEPDGSPATLGGQSFYATCVDTI ICIVFGSLFSLAHGAGWPVLSIVMGQMTDTFV-AGP NGSLIPQDPN - ATHNPNTV ESFEDKMTT 116
ME_pgp	1261	-----PDGPPATLGGQFRYATSVDI ICILFGSLFSLAHGAGWPVLSIVMGQMTDTFV-AGP NGSLIPPGPN - ATHNPNTV ESFEDKMTT 84
MC_pgp	1311	MSSEERKFLADASDEQESYTDKTKTDDEKKKPEGGPPATLGGQFRYATSVDI ICILFGSLFSLAHGAGWPVLSIVMGQMTDTFV-AGP NGSLIPEGPN - ATFNPNAT TESFEDKMTT 118
MG_pgp	1302	MSKSEERKFLADASDEQESYTDKTKTDDEKKKPEGGPPATLGGQFRYATSVDI ICILFGSLFSLAHGAGWPVLSIVMGQMTDTFV-AGP NGSLIPDPN - ATFNPNAT QSFEDKMTT 118
MT_pgp	1295	YALYYLIIGGVPLSGYLQIACFMTACERQVNKIRKQFFQAILRQEI GWFDKHQSGELTTRLSDDLERVREGIDK LSLLIQFVAQFFAGFAIGFYKSWKM TLVMSLTP-LAILGGYFS 235
ME_pgp	1261	YALYYLIIGGVLLSGYLQIACFMTACERQVNKIRKQFFQAILRQEI GWFDKHQSGELTTRLSDDLERVREGIDK LSLLIQFVAQFFAGFAIGFYKSWNM TLVMSLTPLLAILGGYFS 204
MC_pgp	1311	YAIYYLIIGGAVLFSGYLQIACFMTACERQVNKIRKHFFRAILRQEI GWFDKHQSGELTTRLSDDLERVREGIDK LSLLIQFTAQFFAGFAIGFWKSWKM TLVMSLTPVLAILAAYFS 238
MG_pgp	1302	YAIYYLIIGGAVLFSGYLQIACFMTACERQVNKIRKHFFRAILRQEI GWFDKHQSGELTTRLSDDLERVREGIDK LSLLIQFTAQFFAGFAIGFWKSWKM TLVMSLTPVLAILAAYFS 238
MT_pgp	1295	ALM QNF AKREQALYADAGSVAEEVISC MRTVV SFNGQKQEVKRYGKSLEETKQIGIKKS MTVGLLLGSlyLVMGDYALSFWYGNEQVKEYITS MGAEGIT PGTVLTVFFCVMIGSFSIG 355
ME_pgp	1261	GLM QNF AKREQALYADAGSVAEEVISC MRTVV SFNGQKQEVKRYGKSLEETKQIGIKKS MTVGLLLGSlyLVMGDYALSFWYGNEQVKFIT SNGEDGIT PGTVLTVFFCVMIGSFSIG 324
MC_pgp	1311	SLM QNF AKREQALYADAGSVAEEVISC MRTVV SFNGQKQEVKRYGKSLEETKQIGIKKS MTVGLLLGSlyLVMGDYALSFWYGNEQVKEYITS MGAEGIT PGTVLTVFFCVMIGSFSIG 358
MG_pgp	1302	SLM QNF AKREQALYADAGSVAEEVISC MRTVV SFNGQKQEVKRYGKSLEETKQIGIKKS MTVGLLLGSlyLVMGDYALSFWYGNEQVKEYITS MGAEGIT PGTVLTVFFCVMIGSFSIG 358
MT_pgp	1295	NAAPNIGSFVTAKGAAAVVYEIIDRKP IDASSEKGRPLSIQ GALEFLGVNFTY T REDVQVLN FNLSIKPGQTV ALV GSSGCGKS TIVNLIQRFYDPDAGVLLDGNNIKDLNLNL 465
ME_pgp	1261	NAAPNIGSFVTAKGAAAVVYEIIDRKP IDASSEKGRPLSIQ GALEFLGVNFTY T REDVQVLN FNLSIKPGQTV ALV GSSGCGKS TIVNLIQRFYDPDAGVLLDGNNIKDLNLNL 465
MC_pgp	1311	NAAPNIGSFVTAKGAAAVVYEIIDRKP IDASSEKGRPLSIQ GALEFLGVNFTY T REDVQVLN FNLSIKPGQTV ALV GSSGCGKS TIVNLIQRFYDPDAGVLLDGNNIKDLNLNL 478
MG_pgp	1302	NAAPNIGSFVTAKGAAAVVYEIIDRKP IDASSEKGRPLSIQ GALEFLGVNFTY T REDVQVLN FNLSIKPGQTV ALV GSSGCGKS TIVNLIQRFYDPDAGVLLDGNNIKDLNLNL 478
MT_pgp	1295	RQNI GVVSQEPV LGCTIAENIRLGNPNATITIEQAAKQANAHDFIKSLPQSYNTLVGERGA QLSGGQKQ RVATARALIRDP RLTLLDE ATSALDSESENI QEALEKARQGR TTLVIA 595
ME_pgp	1261	RQNI GVVSQEPV LGCTIAENIRLGNPNATITIEQAAKQANAHDFIKSLPQSYNTLVGERGA QLSGGQKQ RVATARALIRDP RLTLLDE ATSALDSESENI QEALEKARQGR TTLVIA 564
MC_pgp	1311	RQNI GVVSQEPV LGCTIAENIRLGNPNATITIEQAAKQANAHDFIKSLPQSYNTLVGERGA QLSGGQKQ RVATARALIRDP RLTLLDE ATSALDSESENI QEALEKARQGR TTLVIA 598
MG_pgp	1302	RQNI GVVSQEPV LGCTIAENIRLGNPNATITIEQAAKQANAHDFIKSLPQSYNTLVGERGA QLSGGQKQ RVATARALIRDP RLTLLDE ATSALDSESENI QEALEKARQGR TTLVIA 598
MT_pgp	1295	HRLSTIQKADIIYVVDKGEIIEQ Q THGDLMDKQGLYHSLVTAQTLVNEDA-----AESALEEDEEEEA VDTPDQTVKRSRSRIKSTSSDDKS PQKLS----RQLSRQTSGLSDGKD 703
ME_pgp	1261	HRLSTIQKADIIYVVDKGEIIEQ Q THGDLMDKQGLYHSLVTAQTLVNEDA-----AESALEEDEEEEA VDTPDQTVKRSRSRIKSTSSDDKS PQKLS----RQLSRQTSGLSDGKD 672
MC_pgp	1311	HRLSTIQKADIIYVVDKGEIIEQ Q THGDLMDKQGLYHSLVTAQTLVNEDA DA GFQNCQDVEFALEEEEEEA VD AVPQTVKRSRSRIKSTSSDDKS PQKLS SRQMSRQLSRQMSQ PDGKD 718
MG_pgp	1302	HRLSTIQKADIIYVVDKGEIIEQ Q THGDLMDKQGLYHSLVTAQTLVNEDA-----VEFALEEEEEEA VD AVPQTVKRSRSRIKSTSSDDKS PQKLS SRQMSRQLSRQMSQ PDGKD 710
MT_pgp	1295	KTDKEEPEE Q EYEP PRY FMH ENQ PE CGFIVL IGIMAS CVAGCTMPAF AIF FG EMIKV F IELGN-----NGL LWSMMFLALGGINFLVYFVQASSFGIS GERLTQR PR LGT FN AYMR 817
ME_pgp	1261	KTDKEEPEE Q EYEP PRY FMH ENQ PE CGFIVL IGIMAS CVAGCTMPAF AIF FG EMIKV F IELGN-----NGL LWSMMFLALGGINFLVYFVQASSFGIS GERLTQR PR LGT FN AYMR 786
MC_pgp	1311	KADKEEPEE Q EYEP PKY FMH ENQ PE CGFIVL IGIMAS CVAGCTMPAF AIF FG EMIKV F IELGN-----NGL LWSMMFLALGGINFLVYFVQASSFGIS GEKLTQR LR LGT FN AYMR 832
MG_pgp	1302	KADKEEPEE Q EYEP PKY FMH ENQ PE CGFIVL IGIMAS CVAGCTMPAF AIF FG EMIKV F IELGN-----NGL LWSMMFLALGGINFLVYFVQASSFGIS GEKLTQR LR LGT FN AYMR 824
MT_pgp	1295	QDIAFYDDKFHSTGALT TRLATDASLVKTATGVR IGMVQSLFGLVAALVIAFY GNALALVVLGIVP IIGFASSLQIKVLGR HEEDKGKLEAGKTA ET NI RTVQSLTTEK FHYH 937
ME_pgp	1261	QDIAFYDDKFHSTGALT TRLATDASLVKTATGVR IGMVQSLFGLVAALVIAFY GNALALVVLGIVP IIGFASSLQIKVLGR HEEDKGKLEAGKTA ET NI RTVQSLTTEK FHYH 906
MC_pgp	1311	QDIAFYDDKFHSTGALT TRLATDASLVKTATGVR IGMVQSLFGLVAALVIAFY GNALALVVLGIVP IIGFASSLQIKVLGR HEEDKGKLEAGKTA ET NI RTVQSLTTEK FHYH 952
MG_pgp	1302	QDIAFYDDKFHSTGALT TRLATDASLVKTATGVR IGMVQSLFGLVAALVIAFY GNALALVVLGIVP IIGFASSLQIKVLGR HEEDKGKLEAGKTA ET NI RTVQSLTTEK FHYH 944
MT_pgp	1295	EYSHSLVGPL RSMIKQ AH WY GIA FLGQGVIFMTYAGAF RF GA WQVEIGEMTADN VFKVFFAIAFTAMVIGSSSFL PEYSKAKHAAGLIFKAFDTVP SID IYSKRGTYLQKVDGLIQFK 1057
ME_pgp	1261	EYSHSLVGPL RSMIKQ AH WY GIA FLGQGVIFMTYAGAF RF GA WQVEIGEMTADN VFKVFFAIAFTAMVIGSSSFL PEYSKAKHAAGLIFKAFDTVP SID IYSKRGTYLQKVDGLIQFK 1025
MC_pgp	1311	EYSHALVGPL RSMIKQ AH WY GIA FLGQGVIFMTYAGAF RF GA WQVEIGEMTADN VFKVFFAIAFTAMVIGSSSFL PEYAKAKHAAGLIFKAFDTIPP ID IYSKRGTYLQKVDGLIQFK 1072
MG_pgp	1302	EYSHALVGPL RSMIKQ AH WY GIA FLGQGVIFMTYAGAF RF GA WQVEIGEMTADN VFKVFFAIAFTAMVIGSSSFL PEYAKAKHAAGLIFKAFDTIPP ID IYSKRGTYLQKVDGLIQFK 1064
MT_pgp	1295	DVNFC Y PTREVKVLKGVMK VEP Q TV ALV GS CGCKSTVISLL QRFYDPESGEIMIDGIDIKDLHLHKMR SFISVVSQEPIL FNCSISDNIA YG-LEETAGMD DDVIAAARDANI HEFI 1176
ME_pgp	1261	DVNFC Y PTREVKVLKGVMK VEP Q TV ALV GS CGCKSTVISLL QRFYDPESGEIMIDGIDIKDLHLHKMR SFISVS-QEPIL FNCSISDNIA YG-LEETAGMD DDVIAAARDANI HEFI 1142
MC_pgp	1311	EVNFC Y PTREVKVLKGVMK VEP Q TV ALV GS CGCKSTVISLL QRFYDPESGEIMIDGIDIKDLHLHKMR SFISVVSQEPIL FNCSIRDNIA YG-LEETAGMD DDIITAARDANI HEFI 1191
MG_pgp	1302	EVSFC Y PTREVKVLKGVMK VEP Q TV ALV GS CGCKSTVISLL QRFYDPESGEIMIDGIDIKDLHLHKMR SFISVVSQEPIL FNCSIRDNIA YG-LEETAGMD DDIITAARDANI HEFI 1183
MT_pgp	1295	TSQPMGYDTIVGEKGT QLSGGQKQ RVATARALIRNP KL LL DEATSALDSESEKL QVEALDKAQEG RTCIVIAHRLSTIQ ADN AVIFVMDSGA IVESG THQTL LAKKGVYNSLVSAQQFI - 1295
ME_pgp	1261	TSQPMGYDTIVGEKGT QLSGGQKQ RVATARALIRNP KL LL DEATSALDSESEKL QVEALDKAQEG RTCIVIAHRLSTIQ ADN AVIFVMDSGA IVESG THQTL LAKKGVYNSLVSAQQFI K 1261
MC_pgp	1311	TSQPMGYDTIVGEKGT QLSGGQKQ RVATARALIRNP KL LL DEATSALDSESEKL QVEALDKAQEG RTCIVIAHRLSTIQ ADN AVIFVMDNGT IVESG THQTL LAKKGVYNSLVSAQQFI K 1311
MG_pgp	1302	TSQPMGYDTIVGEKGT QLSGGQKQ RVATARALIRNP KL LL DEATSALDSESEKL QVEALDKAQEG RTCIVIAHRLSTIQ ADN AVIFVMDNG -TVESG THQTL LAKKGVYNSLVSAQQFI K 1311

Abbildung 23: Vergleich von ABCB verschiedenen *Mytilus*-Arten

Die Aminosäuresequenzen von MT, ME, MG und MC wurden mit dem Programm ClustalX abgeglichen und stehen für *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis* und *M. californianus*. Die fett markierten Bereiche sind die Transmembrandomänen und wurden mit dem Programm Prosite ermittelt. Durch den Polyphobius-Algorithmus wurden die zusätzlich rot gekennzeichneten Transmembranhelices identifiziert. Die charakteristischen ABC-Transporter-Sequenzmerkmale sind gelb hervorgehoben und N-Glykolisierungsstellen türkis markiert.

MG_mrp	1503	MDY NLS VCSSQLSLIDSVTIEKGPS LA EWTPVLVFLGAPLHFLYFKRNL SA IVQYK FILA IFITLLSLSLSYGLRDIDHVLIGEKS PDG FILSISIVLT TILI QDESHKTQ RKKKKRY 120
MC_mrp	1498	MDNLSVNCNTQLSVQDSVTLVVEGS LS QWTPVLVFLAAPHFIFYFKRNFQASVQYK FILA VFITLLGLTRISIGLRDIDHILFGEKSPDGLILSISIVLT ITII QDESHKTQ MKKKKRY 120
ME_mrp	1516	MDY NLS VCSSQLSLIDSVTLEKGPS LA EWTPVLVFLGAPLHFLYFKRNL SA IVQYK FILA IFITLLGLTSLSIGMRDIDHVLIGNKSLDGFILSISIVLT TILI QDESHKTQ TKKKKRY 120
MT_mrp	1118	MDYN LS VNCNTQFSVQDSVTVVEGS LA AWTPVLVFLAAPINVFYFTHNLQAAVVQYK FILA IFITLLGLVLSISIGLRDIDHVLFGKSPDGLILSISIVLT ITII QDESHKTQ RKKKKRN 120
MG_mrp	1503	RFFHIFGLFC SFGISFVSIFQKRKD--VDFQNWELQTEWTTKLYCVLISVYLIESVILVLKQVLGANQSFQKADKADKDVSPKIASFLSRLTWSWVTPFVLFGYRHNLEPSDLWLPLK 238
MC_mrp	1498	RFFRIFGLFC SFGISSAYIIHKRDT--TTVDNKWELQLIEWTTQLYCVLISVYLIESVILVLKQVLGTDQSFQKGNADKDVSPKIASYLSQLTWSWVTPVLVHGXYKHNLEQSDLWPLTP 238
ME_mrp	1516	RFFHIFGLFC SFGISFVFIFQKRKDTAVDFQNWELQTEWTTKLYCVLISVYLIESVILVLKQVLGANQSFQKADKADKDVSPKIASFLSRLTWSWVTPFVLFGYKHNLEPSDLWLPLK 240
MT_mrp	1118	RGFQIFGLF SLGISLAYIFHKRKT--TNVDNNETQLTEWNTKLYCVLICVYLIESVILVLKQVLGINQSFQKADKADKDVSPGNASFLSRLTWSWVTPFVLGYKHNIPEPSDLWLPLK 238
MG_mrp	1503	EHLSTNIIPFDKYWEEVEKATRERQSQEKRIKTTITITVEKKVQANLLRC VIRASGPALLS AFYKLLYH LA EFTFPYIMIRLLIGIARDGKEEIKWGYILAILMFVSIFKSVVLN 356
MC_mrp	1498	GNVSTNIIPIFEKYWEEVEKATRERQSQEKRIKTTITTNVVEKQKANLLNC IIRASGPALLS AFYKLLYH AE FAFPYILRLLIGITKDRKEDIWKGYILAILMFVSITFKSVVLN 356
ME_mrp	1516	EHLSTNIIPFDKYWEEVEKATRERQSQEKRIKTTITITVEKKVQANLLRC VIRALGPALLS AFYKLLYH AE FTFPYIMIRLLIGIARDGKEEIKWGYILAILMFVSIFKSVVLN 358
MT_mrp	1118	EHISTNIIPFDKYWEEVEKAARERQSQGKRIKTTITITVEKKVQANLLRC VIRASGPALLS AFYKLLYH AE FTFPYIMIRLLIGIARDGKEEIKWGYILAILMFVSIFKSVVLN 356
MG_mrp	1503	IHINETQ EAGRSNWVALTAIYKKTLLRLTNAAKQDSTVGEIINLMSVDAEKIGNCMV SVNDVNAVPL LLFSISFYFLWQTLG PSVLVGLII ILLVLPVNVFLMKSKKHLQLESMDLKDARI 476
MC_mrp	1498	LHIKETQ EAGRSNWVALTAIYKKTLLRLTNAAKQDSTVGEIINLMSVDAEKIGNCMV SLNEVNAVPL LLFSMAFYFLWQTLG SVVGLII ILLVLPVNVFLMKSKKHLQLESMDLKDARI 476
ME_mrp	1516	IHINETQ EAGRSNWVALTAIYKKTLLRLTNAAKQDSTVGEIINLMSVDAEKIGNCMV SVNEVNAVPL LLFSISFYFPWQTLG PSVLVGLII ILLVLPVNVFLMKSKKHLQLESMDLKDARI 478
MT_mrp	1118	IHINGTQ EAGRSNWVALTAIYKKTLLRLTNAAKQDSTVGEIINLMSVDAEKIGNCMV SVNDVNAVPL LLFSISFYFLWQTLG PSVFT ----- 442
MG_mrp	1503	KKMNEVLNGIKVL KMYAWEECFEKRILEIRDKELHILAGR GIQNM MHVIAWTP PFMISLCT FGAYV LDANNVMSAEKV FVSLSLFNILQYSLHLLPHVINFYIQTAVSLKRIQNFLNN 596
MC_mrp	1498	KKMNEVLNGIKVL KMYAWEECFEKCIILKIRDQELHILAGR GIQNM MHVIAWTP PFISLCT FGAYV FDVNNVMSAEKV FVSLSLFNILQYSLHLLPHVINFYIQTAVSLKRIQNFLNN 596
ME_mrp	1516	KKMNEVLNGIKVL KMYAWEECFEKRILEIRDKELHILAGR GIQNM MHVIAWTP PFMISLCT FGAYV LDANNVMSAEKV FVSLSLFNILQYSLHLLPHVINFYIQTAVSLKRIQNFLNN 598
MT_mrp	1118	----- 598
MG_mrp	1503	EELDTSIITRNTDSEYGITVEDGTF I DDTMEPTLKDITFKIPQGSVLAIV CSVGAGKS SLLSAILGEMESETAQVNIKGSIAVVAQQPWIMNTSLQONILFGEDLDKKKYEFIVDASAL 716
MC_mrp	1498	EELDTSIITRNTDSEYGITVEDGTF V DDTAMEPTLKNIIRFKIPGGLVAIV GSVGAGKS SLLSAILGEMESETAQVNIKGSIAVVAQQPWIMNTSLQONILFGQDLDDKKKYEFIVDASAL 716
ME_mrp	1516	EELDTSIITRNTDSEYGITVEDGTF I DDTMEPTLKDITFKIPQGSVLAIV GSVGAGKS PLLSAILGEMESQTAQVNIKGSIAVVAQQPWIMNTSLQONILFGEDLDKKKYEFIVDASAL 718
MT_mrp	1118	----- 718
MG_mrp	1503	RKDLEVLPGGDQTEIGEGIN LSGGQQRVSLARA VYQNA DIYLLD LSAVDAHVGHKHFDEIIGNLGLKEKTRILVTHGLNIRKVDIIITMADGRIGEIGSYDELTEHGGPFAGFM 836
MC_mrp	1498	RKDLEVLPGGDQTEIGEGIN LSGGQQRVSLARA VYQNA DIYLLD LSAVDAHVGHKHFDEIIGSNGLLKEKTRILVTHGLNIRKVDIIITMVGGQIGEIGSFDELTHGGPFAGFM 836
ME_mrp	1516	RKDLEVLPGGDQTEIGEGIN LSGGQQRVSLARA VYQNA DIYLLD LSAVDAHVGHKHFDEIIGSNGLLKEKTRILVTHGLNIRKVDIIITMVDGRIGEIGSFDELTEHGGPFAGFM 838
MT_mrp	1118	-----MVDGRIGEIGSDEITEHGGPFAGFM 468 .: .: *. .: .: .:
MG_mrp	1503	KNYLAELSTDDQENIVSYRKLEGKSTTDETIHSTHSDIVHSISDINSPIARQMS-----RQTSCESESSEVLSHNTLVQEENTEPEGSVKLVNIMTYVRA VGKIVIVIL 943
MC_mrp	1498	KTYMAEELSTKDAQNKDSYRTLEGIPNDETIMHSHSDIVHSISDINSPIARQMS-----RQTSCESESSEVLHNNLVQEENTESVSVKLVNIMTYARA VGFKVIVIL 943
ME_mrp	1516	KNYLAELSTDDQENIVSRTLEGKSTTDETIHSTHSDIVHSISDINSPIARQMSRQMSRQMSRQTSCESESSEVLSHNTLVQEENGESGSKVLNIMTYARA VGFKTIVIVIL 953
MT_mrp	1118	KNYLAELSDDEQENIVSHRPLERIPTTDETIHSTHSDIVHSISDINSPIARQMSR----QMSRQTSCESESSEVLHNTLVQDENTESGSKVLNIMTYARA VGKIVIVIL 579
MG_mrp	1503	TMSMVHE --EMYLDVWLSKW TQDHTNGT VNGTQNRRLGIYGAIGLFRGV SIFITETFTVYGL IKATRKHLKDLLRNILRSPMSFFDTTP--VGRIVNRFSDKIETIDDELIYQ FKDVVIC 1060
MC_mrp	1498	AINMVHE VAEMYLDVWLSKW TQDHTNGT VNETQNRRLGIYGAIGLFRGV SIFVTFVYGL IKATRKHLRDLNRILRSPMSFFDTTP--VGRIVNRFSDKIETIDDELIYQ FKDVVIC 1062
ME_mrp	1516	TMSMVHE LAEMYLDVWLSKW TQDHTNGT ANETQNRRLGIYGAIGLFRGV SIFITETFTVYGL IKATRKHLKDLLRNILRSPMSFFDTTP--VGRIVNRFSDKIETIDDELIYQ FKDVVIC 1072
MT_mrp	1118	TMSMVHE LAEMYLDVWS--KW TQ --HTN-- TNETQ NRN--RLG--YGAIGLFRGV S --ITETFTVYGLIKA--RKLKHLKDLLRN--RSPMSFFDTTP--VGRIV--RFSKDIETIDDELIYQ FKDVVIC 686
MG_mrp	1503	LLVLNCNTV IISTG TPQFL IMLPVTVVYFALQRLYV STSRQLRTMASA ARSPIFS HFGETISGCSTIRAFQ QEKRFMTESARRFDELNTRRSLSARVEKW LHRLDWLGSII VLVCV ML 1180
MC_mrp	1498	FLFVNCNTV IISTG TPHFL IMLPVTVVYFALQRLYV STSRQLRMAS AARSPIFS HFGETISGCSTIRAFQ QEKRFMTESARRFVLNTRRSLSARVEKW LHRLDWLGSII VLVCV LL 1182
ME_mrp	1516	LLVLNCNTV IISTG TPQFL IMLPVTVVYFALQRLYV STSRQLRTMASA ARSPIFS HFGETISGCSTIRAFQ QEKRFMTESARRFDELNTRRSLSARVEKW LHRLDWLGSII VLVCV LL 1192
MT_mrp	1118	LLVLNCNTV IIS--G TPQFL IMLP----VYV ALQRLYV STSRQLRTMASAARSPIFS HFGETISGCSTIRAFQ QEKRFMTESARRFDELNTRRSLSARVEKW LHRLDWLGSII VLVCV LL 802
MG_mrp	1503	VVVNKDDIS PGIVGLAI ITYALNV NTNCIEWLKLTNAETNIIISLERIKEYSETHTEADWIVENKRPENDWPNEGVMQDN YGVRY REGLEVLVLSISCKIAPCEKIGIV GRTGAGKS SLT 1300
MC_mrp	1498	VVVNKDDIS PGIVGLAI ITYALNV NTNCIEWLKLTNVGTNIIISLERIKEYSETPEADWIVENKRPENDWPNEGVMQDN YGVRY REGLEVLVLSISCKIAPCEKIGIV GRTGAGKS SLT 1302
ME_mrp	1516	VVVNKDDIS PGIVGLAI ITYALNV NTNCIEWLKLTNAETNIIISLERIKEYSETHTEADWIVENKRPENDWPNEGVMQDN YGVRY REGLEVLVLSISCKIAPCEKIGIV GRTGAGKS SLT 1312
MT_mrp	1118	VVVNKDDIS PGIVGLAI ITYALNV NTNCIEWLKLTNAETNIIISLERIQEYSETPTEAVVETKRPENDWPNEGVMQDN YGVRY REGLEVLVLSITCKIAPCEKIGIV GRTGAGKS SLT 922
MG_mrp	1503	MGLFRIIEKAQGRILIDGIDISTIGLHDLRSKITIIPQDPVFLSGTMRMNLDPFDEYSNEDIWALNHAHLKAFVIGLKDGLDHCSEGGDN LSVGQRQLIC ARALLRKTK ILVLDEAT 1419
MC_mrp	1498	MGLFRIIEKAQGCIVIDGIDISTIGLHDLRSKITIIPQDPVFLSGTMRMNLDPFDEYSNEDIWALNHAHLKAFVIGLKDGLDHCSEGGDN LSVGQRQLIC ARALLRKTRIL VLDEAT 1422
ME_mrp	1516	MGLFRIIEKAQGRILIDGIDISTIGLHDLRSKITIIPQDPVFLSGTMRMNLDPFDEYSNEDIWALNHAHLKAFVIGLKDGLDHCSEGGDN LSVGQRQLIC ARALLRKTK ILVLDEAT 1432
MT_mrp	1118	MGLFRIIEKAQGRIIIDGIDISTIGLHDLRSKITIIPQDPVFLSGTMRMNLDPFDEYSNEDIWALNHAHLKAFVIGLKDGLDYRCSEGGDN LSVGQRQLIC ARALLRKTK ILVLDEAT 1042
MG_mrp	1503	AAVDLETDDLQITTIIRTEFADCTILTIAHRLNTIMDYTRIMVLDCCGIREFDSPTNLLLDKKSIFYGMSKDAGLVSWCSLIGFY 1503
MC_mrp	1498	AAVDLETDDLQITTIIRTEFADCTILTIAHRLNTIMDYTRIMVLDCCGIREFDSPTNLLLDKKSIFYGMAKDAGLV----- 1498
ME_mrp	1516	AAVDLETDDLQITTIIRTEFADCTILTIAHRLNTIMDYTRIMVLDCCGIREFDSPTNLLLDKKSIFYGMSKDAGLVSWCSLIGFY 1516
MT_mrp	1118	AAVDLETDDLQITTIIRTEFADCTILTIAHRLNTIMDYTRIIIVLDCCGIREFDSPTNLLLDKKSIFYGMAKDAGLV----- 1118

Abbildung 24: Vergleich von ABCC verschiedener *Mytilus*-Arten

Die Aminosäuresequenzen von MT, ME, MG und MC wurden mit dem Programm ClustalX abgeglichen und stehen für *M. trossulus*, *M. galloprovincialis*, *M. edulis* und *M. californianus*. Die fett markierten Bereiche sind die Transmembrandomänen und wurden mit dem Programm Prosite ermittelt. Durch den Polyphobius-Algorithmus wurden die zusätzlich rot gekennzeichneten Transmembranhelices identifiziert. Die charakteristischen ABC-Transporter-Sequenzmerkmale sind gelb hervorgehoben und N-Glykolisierungsstellen türkis markiert.

4.2.3 PHYLOGENETISCHE EINORDNUNG DER ERMITTELTEN TRANSPORTERPROTEINE AUF NUKLEINSÄUREEBENE

Vergleich der ABCB-Transportsequenzen zwischen den vier *Mytilus*-Arten

Die verschiedenen cDNA-Sequenzen für ABCB zeigen hohe Identitätswerte von 92 – 99% auf Nukleinsäureebene zueinander auf (Abb. 25). *M. edulis* hat eine hohe Übereinstimmung von 98% mit *M. trossulus*. Im Vergleich von *M. edulis* zu *M. californianus* und *M. galloprovincialis* kann eine geringe Abweichungen festgestellt, werden wobei der Identitätswert bei 92% liegt. *M. trossulus* hingegen weist eine Übereinstimmung von 93% gegenüber den beiden Arten auf. Eine sehr hohe Übereinstimmung miteinander besitzen *M. californianus* mit *M. galloprovincialis* mit 99%. Die neu amplifizierte cDNA-Sequenz von ABCB der *M. edulis* weist eine Abweichung von 8% zu der früheren ermittelten cDNA-Sequenz von ABCB auf.

In diesen Vergleich wurden weitere ABCB-Homologe anderer Organismen mit einbezogen, welche Identitäten von 47–57 % mit den *Mytilus*-Arten aufwiesen. Dabei hat die Nukleinsäuresequenz von dem ABCB-Protein von *Homo sapiens* die größte Ähnlichkeit zu den Muschelsequenzen (Abb. 25).

Vergleich der ABCC-Transportsequenzen zwischen den vier *Mytilus*-Arten

Insgesamt zeigen die ABCC-Sequenzen für die vier *Mytilus*-Arten hohe Identitätswerte von 90–98% untereinander auf. Die cDNA-Sequenz von *M. trossulus* hat die höchste Übereinstimmung mit 93% zu *M. edulis* und *M. galloprovincialis*. Jedoch weist sie eine geringere Ähnlichkeit mit 90% zu *M. californianus* auf. Ein hoher Identitätswert liegt zwischen den ABCC-Orthologen von *M. edulis* und *M. galloprovincialis* mit 98 % vor.

Die hinzugezogene ABCC-Sequenz von *Homo sapiens* weist eine ähnliche Übereinstimmung mit 51- 52% zu den *Mytilus*-Arten auf, wie seine ABCB-Sequenz im Vergleich zu den Muschel-Arten (Abb. 25).

Die Ähnlichkeit der ABCC-Transportersequenzen zu den ABCB-Transportersequenzen innerhalb der *Mytilus*-Arten liegt bei 39%, ausgenommen von *M. trossulus*, welche eine Übereinstimmung von 38% hat.

4.3 TOXIZITÄT GETESTETER SCHÄDLICHER SUBSTRATE

Es wurde ein Toxizitätstests mit den Larven von *Dreissena polymorpha* und Dacthal in zwei unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Nach einer Expositionsdauer von 24 Std. wurden die Larven nach definierten Kriterien in normal- und fehlentwickelte Larven unterschieden. Diese ermittelten Werte wurden analysiert und daraus folgend die Konzentration an Dacthal für die Exposition der Larven für die RT-qPCR gewählt.

4.3.1 ERMITTLUNG DER PROZENTUALEN ANZAHL DER FEHLENTWICKELTEN LARVEN

Es wurde die gesamte Menge der abfiltrierten Larven mit Hilfe eines Mikroskopes gezählt und dabei in die normal- und fehlentwickelten Larven unterschieden. Die normalen Larven besaßen eine D-Form, währenddessen die fehlentwickelten Larven größer und eine rundliche Form hatten (Abb. 26), sowie teilweise durchscheinend waren (Abb. 27).

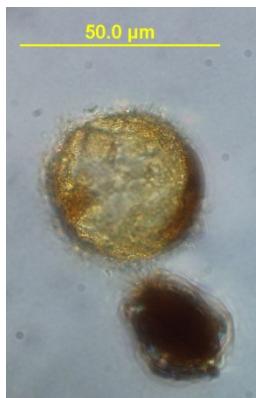


Abbildung 26: Beispiel a) einer fehlentwickelten Larve
Die anormale Larve oben ist deutlich größer als die normale Larven unten



Abbildung 27: Beispiel b) einer fehlentwickelten Larve
Die Organe sind nicht homogen verteilt

Um eine Aussage über das toxische Verhalten treffen zu können, wurden %-Überlebensrate und %-Rate der Fehlentwicklungen berechnet (Tab. 29). Dabei ergibt sich, dass zwischen den untersuchten Behandlungen, der Kontrolle und Dacthal 1 ppm/10 ppm, die Überlebensrate zwischen 32 und 49% annähernd übereinstimmt. Die Fehlentwickeltenrate steigt jedoch von der Kontrolle mit 13% bis Dacthal 1 ppm auf 21%. Dacthal 10 ppm weist mit 28 % die höchste Fehlentwickeltenrate auf (Tab. 33).

Tabelle 33: Test der toxischen Wirkung von Dacthal auf die Larven der *Dreissena polymorpha*

vor der Behandlung in 40ml	nach der Behandlung in 300µl			Behandlung	Überlebensrate in %	Fehlentwickelte in %
	total	normal	anormal			
4000	153	131	22	Kontrolle A	38,25	14,38
4000	166	143	23	Kontrolle B	41,50	13,86
4000	144	113	31	Dacthal 1ppm A	36,00	21,53
4000	129	101	28	Dacthal 1ppm B	32,25	21,71
4000	197	141	56	Dacthal 10 ppm A	49,25	28,43
4000	174	140	34	Dacthal 10 ppm B	43,50	19,54

4.3.2 FISHER'S EXAKT TEST

Die Angabe, dass die Fehlentwickelten-Anzahl mit ansteigender Dacthal-Konzentration zunimmt, welches aus der %-Berechnung der Rate der fehlentwickelten Larven resultiert, wurde weiterhin durch die Ausführung des Fisher's-Exakt Test untermauert.

Dazu wurde erst untersucht, ob Unterschiede zwischen den Replikaten einer Behandlung bestehen und der ermittelte P-Wert in der Spalte a für die einzelnen Behandlungen angegeben. Dabei ergab sich für alle ein $P > 0,05$, wodurch für die weiteren Betrachtungen der Mittelwert der Replikate gebildet werden konnte. Danach wurden die unterschiedlichen Behandlungen miteinander verglichen (Tab. 34).

Spalte b: Kontrolle vs. Dacthal 1ppm
 Spalte c: Kontrolle vs. Dacthal 10 ppm
 Spalte d: Dacthal 1ppm vs. Dacthal 10 ppm

Dabei ergab sich, dass zwischen der Kontrolle und Dacthal 1 ppm mit einem $p = 0.018$, sowie Dacthal 10 ppm mit $p = 0.001$ die Anzahl der normal- und fehlentwickelten Larven von der Behandlung abhängig ist und somit die Werte verschieden sind. Im Vergleich von Dacthal 1 ppm mit Dacthal 10 ppm wurde ein $p = 0.45$ errechnet, welches aussagt, dass die Behandlungen keinen Unterschied in der Anzahl der fehlentwickelten und normalen Larven aufweisen (Tab. 34).

Tabelle 34: Auswertung des Toxizitätstestes mit Hilfe des Fisher's Exakt Tests

Behandlung			2-Tail : p-value				A + B	
	normal	anormal	a	b	c	d	normal	anormal
Kontrolle A	131	22	1			0,45	274	45
Kontrolle B	143	23						
Dacthal 1ppm A	113	31	1			0,001	214	59
Dacthal 1ppm B	101	28						
Dacthal 10 ppm A	141	56	0,052	0,018		281	90	
Dacthal 10 ppm B	140	34						

4.4 UNTERSUCHUNG DER GENETISCHEN EXPRESSION AUSGEWÄHLTER ABC-TRANSPORTER AN *DREISSENA POLYMORPHA*

Die Larven der *Dreissena polymorpha* wurden mit den Substanzen Dacthal und anorganischem Quecksilber inkubiert. Danach wurden die Larven durch Filtration und Zentrifugation konzentriert und die %-Anzahl der überlebenden Larven bestimmt und dieses ausgewertet. Aus den Larven wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, welche der Realisierung der RT-qPCR für die ABC-Transporter ABCB und ABCC diene. Aus den gewonnenen Daten wurden unter Berücksichtigung der Schmelzpunktanalyse und Primer-

Effizienz die relative Expression von ABCB und ABCC berechnet und mit dem Statistik Programm SPSS10.0 analysiert.

4.4.1 ABHÄNGIGKEITEN DER ÜBERLEBENSRATE

Die grundlegenden Expositionsversuche für die RT-qPCR wurden 3-mal an unterschiedlichen Tagen mit verschiedenen Larvenstadien und Muschelpopulationen durchgeführt. Der Versuch wurde einmal mit 24 Std. Larven (Tab. 31) und frisch befruchteten Eiern (Tab. 32) einer „alten“ Muschel-Population durchgeführt, welche seit 2 Monaten unter Laborbedingungen gehalten wurde. Ein weiterer Versuch wurde mit frisch befruchteten Eiern und einer neu gesammelten Muschel-Population durchgeführt. Dabei wurde die Larvenkonzentration vor und nach der Behandlung durch Zählen bestimmt (Tab. 35,36,37).

Tabelle 35: Expositionsversuch vom 09.07.2010

Behandlung	vor der Behandlung	nach der Behandlung	Überlebt in %
Kontrolle A	50000	8000	16,00
Kontrolle B	50000	8400	16,80
Aceton A	50000	6600	13,20
Aceton B	50000	11200	22,40
Dacthal 0,5ppm A	50000	5000	10,00
Dacthal 0,5ppm B	50000	15200	30,40
Dacthal 2ppm A	50000	11400	22,80
Dacthal 2ppm B	50000	11200	22,40
Hg 1ppb A	50000	14000	28,00
Hg 1ppb B	50000	17600	35,20

Tabelle 36: Expositionsversuch vom 20.07.2010

Behandlung	vor der Behandlung	nach der Behandlung	Überlebt in %
Kontrolle A	120000	96600	80,50
Kontrolle B	120000	89200	74,33
Aceton A	120000	109600	91,33
Aceton B	120000	79200	66,00
Dacthal 0,5ppm A	120000	55600	46,33
Dacthal 0,5ppm B	120000	89200	74,33
Dacthal 2ppm A	120000	92600	77,17
Dacthal 2ppm B	120000	86000	71,67
Hg 1ppb A	120000	73800	61,50
Hg 1ppb B	120000	88000	73,33

Tabelle 37: Expositionsversuch vom 06.08.2010

Behandlung	vor der Behandlung	nach der Behandlung	Überlebt in %
Kontrolle A	130000	40860	31,43
Aceton A	130000	42840	32,95
Aceton B	130000	43020	33,09
Dacthal 2ppm A	130000	16380	12,60
Dacthal 2ppm B	130000	22320	17,17

Es ist erkennbar, dass die Überlebensraten zwischen den unterschiedlichen Versuchen stark schwankten. Die Überlebensrate innerhalb der Behandlung eines Versuches ist hingegen nahezu konstant (Abb. 28). Jedoch wird bei dem Einsatz von 24 Std. Larven mit 21,72% die geringste Überlebensrate verzeichnet. Weiterhin ist bei den Eiern der neu gesammelten Population mit 71,65% eine höhere Überlebensrate sichtbar als bei der „alten“ Muschelpopulation mit 26,45% (Abb. 29).

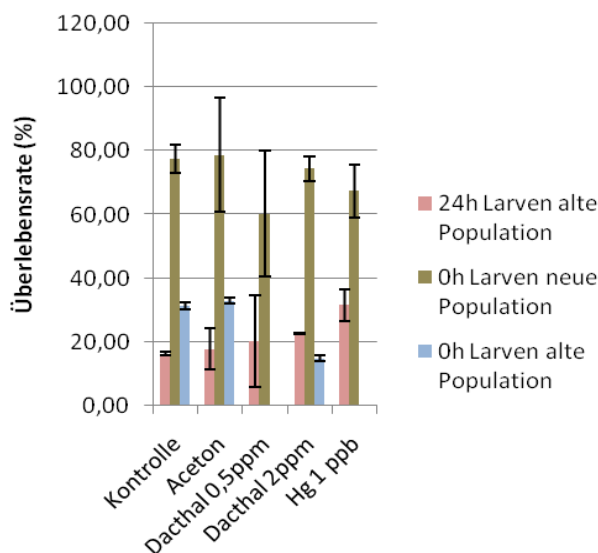


Abbildung 28: Überlebensrate verschiedener Larven für unt. Behandlungen

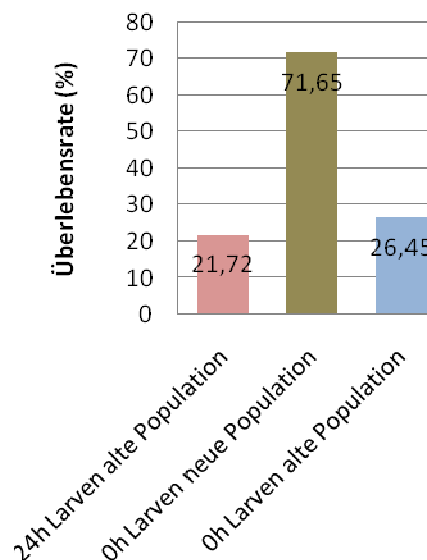


Abbildung 29: Abhängigkeit der Überlebensrate von Population

4.4.2 BESTIMMUNG DER PRIMEREFFIZIENZ UND SCHMELZPUNKTANALYSE

Eine gute Qualität der cDNA bzw. der extrahierten RNA, die cDNA-Konzentration, die Primer-Konzentration, sowie die Qualität der gewählten und erstellten Primer bestimmen maßgeblich das Ergebnis einer RT-qPCR. Weitere Einflüsse sind die Pipettiervarianz, sowie die Wahl eines geeigneten Referenzgens. Die folgenden Untersuchungen dienen der Sicherstellung einer qualitativ gut durchführbaren qPCR zur Erzielung zuverlässiger Resultate.

Die durch die RT-qPCR generierten PCR-Produkte der untersuchten Transkripte von P-gp, MRP und ribosomalem Protein S3 wurden einer Schmelzpunktanalyse unterzogen, um die Spezifität der verwendeten Primerpaare zu untersuchen. Diese ergibt je Gen und dem jeweiligen Primerpaar nur einen signifikanten Peak, welches der berechneten Schmelztemperatur des PCR-Produktes entspricht. Es sind keine störenden Sekundärprodukte, wie Primerdimer, erkennbar (Abb. 30, 31, 32).

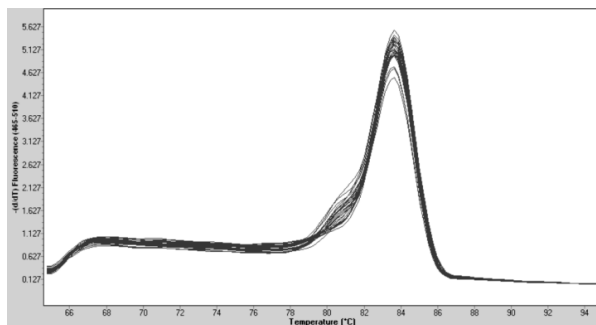


Abbildung 30: Schmelzpunktkurve von MRP

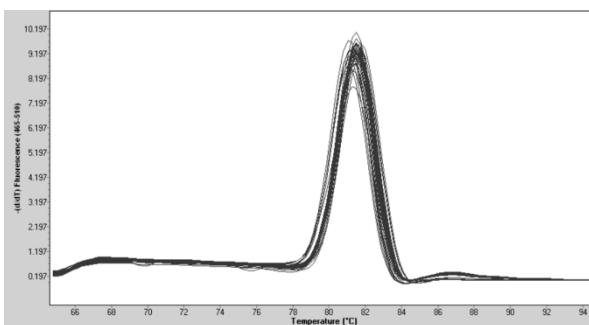


Abbildung 31: Schmelzpunktkurve von Pgp

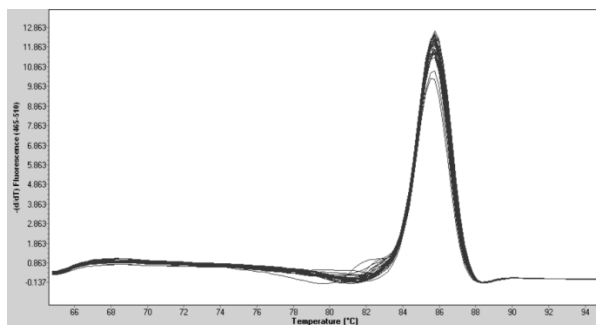


Abbildung 32: Schmelzpunktkurve von S3

Für die Berechnung der Primereffizienz wurden Standardkurven aus 4 Verdünnungsstufen in 1:2 der Probe Hg A 1ppb erstellt und aus diesem Anstieg die Effizienz der eingesetzten Primer ermittelt.

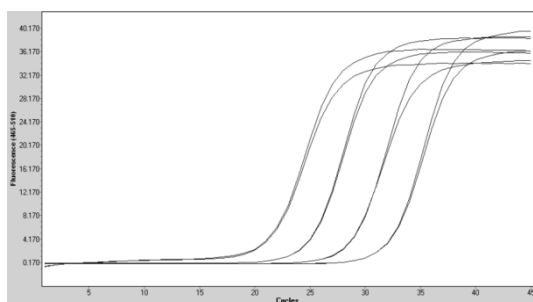


Abbildung 33: Standardkurve für P-gp

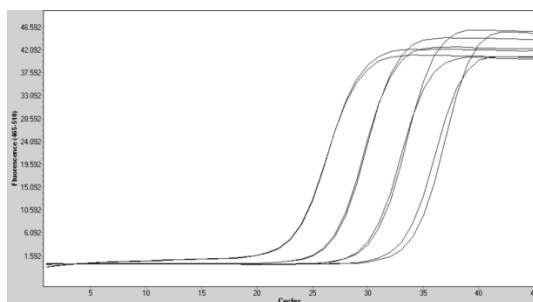
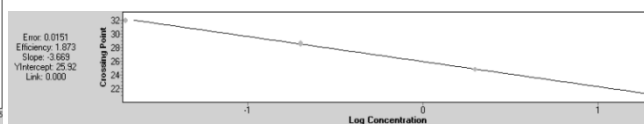
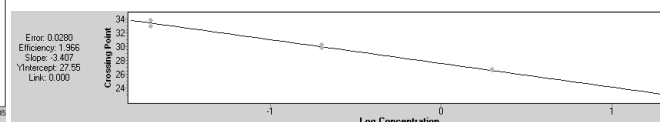


Abbildung 34: Standardkurve für MRP



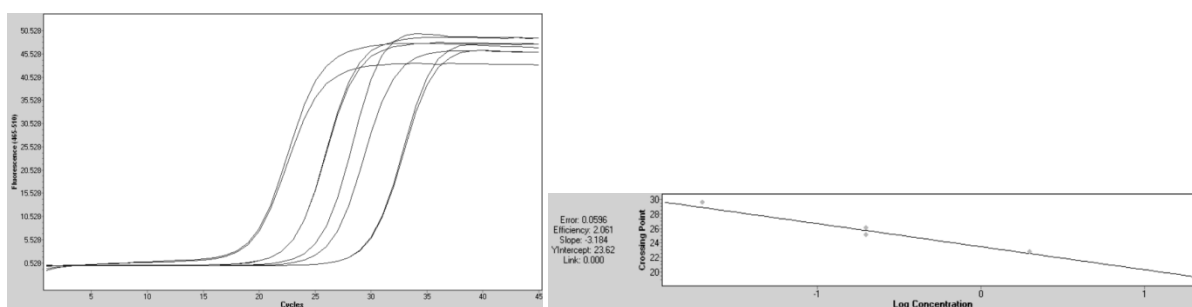


Abbildung 35: Standardkurve für S3

Dabei ergaben sich Effizienzen im gewünschten Bereich von 1,8 bis 2,0 (Abb. 33, 34, 35). Wodurch die Primer genutzt und die Statistik nach Formel 6 siehe 3.10.5 durchgeführt werden konnte.

Das Auftragen der c_T – Werte (*cycle threshold*-Schwellenwertzyklus) des als Referenzgen verwendeten ribosomalen Proteins S3 in Abhängigkeit der unterschiedlichen Behandlungen ergibt einen relativ konstanten Wert um die 20 (Abb. 36).

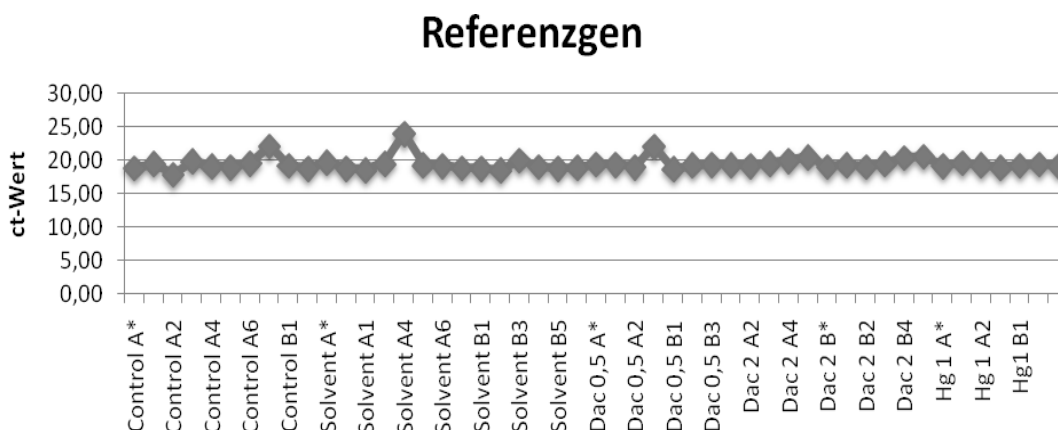


Abbildung 36: Expression des Referenzgen S3

Es wurden die ermittelten c_T -Wert gegen die untersuchte Probe aufgetragen. Dabei ergab sich, dass S3 gleichmäßig in Unabhängigkeit von den Einwirkenden Stoffen exprimiert wird.

4.4.3 BESTIMMUNG DER RELATIVEN EXPRESSION VON ABCB UND ABCC

Durch die Zugabe von Dacthal und Quecksilber wurde die relative Expression von P-gp und MRP verändert. Dabei wurden in der relativen Expression von P-gp mit rund 2 und MRP mit rund 1 zwischen der Kontrolle und der mit Aceton behandelten Probe keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Mit der Zunahme der Konzentration an Dacthal erhöht sich die relative Expression für P-gp auf 4 und für MRP auf 3. Für das Substrat anorganisches Quecksilber wurde die höchste relative Expression für beide ABC-Transporter P-gp und MRP festgestellt. Außerdem ist die relative Expression von P-gp unabhängig von der Behandlung stetig größer als von MRP. Trotz der hohen Standardabweichungen ist eine

Zunahme der relativen Expression der ABC-Transporter von der Kontrolle über Dacthal bis hin zu Quecksilber zu erkennen (Abb. 37).

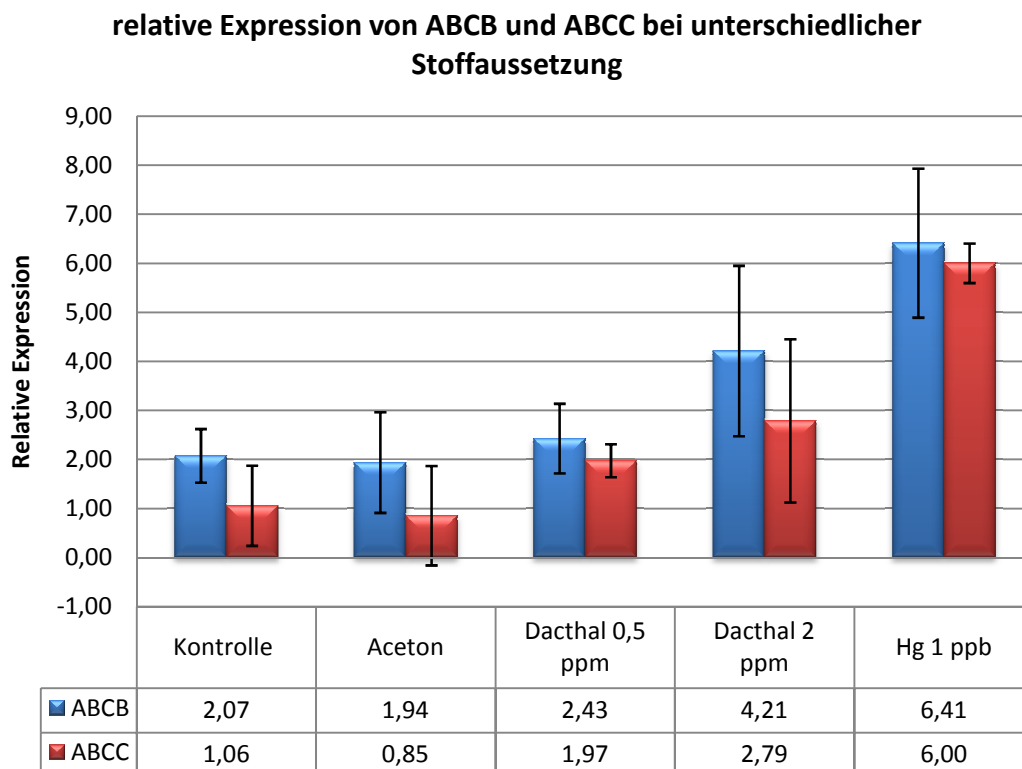


Abbildung 37: Abhängigkeit der relativen Expression von PGP und MRP von unterschiedlichen Behandlungen

Durch einen Vergleich der relativen Expression zueinander wurde festgestellt, dass die mit anorganischem Quecksilber exponierten Proben ABCB dreimal höher und ABCC rund sechsmal höher exprimiert waren als in einer unbehandelten Probe. Jedoch gegenüber Dacthal 2 ppm ABCB und ABCC nur rund 2 mal höher exprimieren (Tab. 38+39).

Tabelle 38: Vergleich der relativen Expression von PGP zwischen den verschiedenen Behandlungen

	Kontrolle	Aceton	Dac 0,5 ppm	Dac 2 ppm	Hg 1ppb
Kontrolle		0,93	1,17	2,03	3,09
Aceton	1,07		1,25	2,17	3,31
Dac 0,5 ppm	0,85	0,80		1,73	2,64
Dac 2 ppm	0,49	0,46	0,58		1,52
Hg 1 ppb	0,32	0,30	0,38	0,66	

Tabelle 39: Vergleich der relativen Expression von MRP zwischen den verschiedenen Behandlungen

	Kontrolle	Aceton	Dac 0,5 ppm	Dac 2 ppm	Hg 1 ppb
Kontrolle		0,81	1,87	2,64	5,68
Aceton	1,24		2,31	3,26	7,02
Dac 0,5 ppm	0,53	0,43		1,41	3,04
Dac 2 ppm	0,38	0,31	0,71		2,15
Hg 1 ppb	0,18	0,14	0,33	0,46	

4.4.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG DER ERMITTELTEN RELATIVEN EXPRESSION FÜR ABCB UND ABCC

Für die statistische Auswertung der gewonnenen Daten über die relative Expression von ABCB und ABCC der *Dreissena polymorpha* aus der RT-qPCR wurde vorangehend der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt, um einen Überblick darüber zu erhalten, ob sich die Daten normal verhalten. Dabei ergaben sich asymptotische Signifikanz-Werte von 0.018 für P-gp und 0,014 für MRP, woraus resultiert, dass sich die Werte für P-gp und MRP nicht normal verhalten, da wahrscheinlich eine zu hohe Varianz der Werte vorliegt (Abb. 38). Daher konnte kein *One Way Anova*-Verfahren gewählt werden, sondern es wurde der Kruskal Wallis-Test angewandt.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		pgp	mrp
N		45	45
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	3,3729	2,3382
	Std. Deviation	2,03535	2,03231
Most Extreme Differences	Absolute	,229	,235
	Positive	,229	,235
	Negative	-,107	-,101
Kolmogorov-Smirnov Z		1,538	1,576
Asymp. Sig. (2-tailed)		,018	,014

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Abbildung 38: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests

Für die Anwendung des Kruskal-Wallis-Tests wurden die erhaltenen Daten für die ABC-Transporter ABCB und ABCC zuvor in ihre verschiedenen Behandlungen und Replikate untergliedert. Dabei wurden drei verschiedene Ansätze angewandt. In dem ersten Ansatz wurden die verwendeten Stoffe (Kontrolle=1; Aceton=2; Dacthal 0,5 ppm=3; Dacthal 2 ppm=4; anorganisches Quecksilber=5) als Behandlung und die verwendeten Flaschen als Replikate gesehen (Abb. 39). Eine weitere Möglichkeit bestand darin, die verwendeten Flaschen als Behandlung und jede Flasche als ein Replikat anzunehmen (Abb. 40). Eine andere Variante war es, die Behandlung nach dem durchgeführten Tag und der verwendeten Substanz aufzuteilen und die Flaschen als Replikate anzusehen (Abb. 41). Über die Median-Werte (MW) kann eine Gruppierung der ermittelten Daten erreicht werden. Alle drei Ansätze ergeben, dass sich für P-gp die unbehandelten und mit Aceton behandelten Proben mit einem MW von circa 14 und für MRP mit rund 13 kaum voneinander unterscheiden und die erste niedrigste Gruppe bilden. Die mit Dacthal 0,5 ppm exponierten Proben weisen mit einem MW von 18 für P-gp einen geringen Unterschied zu Kontrolle und Aceton auf, wohingegen es eine größere Differenz in MRP mit 25 aufweist. Die Behandlung mit Dacthal 2 ppm besitzt in P-gp mit 31 einen höheren Abstand zu Dacthal 0,5 ppm als in MRP mit 28.

Den höchsten MW verzeichnet die mit anorganischem Quecksilber behandelte Probe für beide untersuchte ABC-Transporter.

Ranks

treatment		N	Mean Rank
pgp	1,00	8	14,00
	2,00	12	14,67
	3,00	7	18,21
	4,00	11	31,23
	5,00	7	39,43
	Total	45	
mrp	1,00	8	13,69
	2,00	12	12,00
	3,00	7	25,43
	4,00	11	28,23
	5,00	7	41,86
	Total	45	

Abbildung 39: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests von Variante 1

Ränge

Behandlung		N	Mittlerer Rang
Pgp	1,00	5	16,20
	2,00	3	10,33
	3,00	7	14,14
	4,00	5	15,40
	5,00	7	18,21
	6,00	7	29,93
	7,00	4	33,50
	8,00	7	39,43
	Gesamt	45	
MRP	1,00	5	16,30
	2,00	3	9,33
	3,00	7	13,43
	4,00	5	10,00
	5,00	7	25,43
	6,00	7	29,79
	7,00	4	25,50
	8,00	7	41,86
	Gesamt	45	

Abbildung 40: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests von Variante 2

Ränge			
	Behandlung	N	Mittlerer Rang
Pgp	1,00	3	19,67
	2,00	3	10,33
	3,00	2	11,00
	4,00	4	11,50
	5,00	2	18,00
	6,00	3	17,67
	7,00	3	13,67
	8,00	4	16,25
	9,00	3	20,83
	10,00	3	17,17
	11,00	2	33,00
	12,00	4	39,50
	13,00	2	34,00
	14,00	3	42,67
	15,00	4	37,00
	Gesamt	45	
MRP	1,00	3	18,17
	2,00	3	9,33
	3,00	2	13,50
	4,00	4	12,75
	5,00	2	12,50
	6,00	3	14,33
	7,00	3	8,33
	8,00	4	24,00
	9,00	3	27,33
	10,00	3	20,50
	11,00	2	25,00
	12,00	4	36,75
	13,00	2	26,00
	14,00	3	40,67
	15,00	4	42,75
	Gesamt	45	

Abbildung 41: statistische Auswertung der Daten mit Hilfe des Kruskal-Wallis Tests von Variante 3

5 DISKUSSION

Miesmuscheln werden auch als Kläranlage der Meere bezeichnet, da sie durch ihre hohe Filtrationsleistung von bis zu 20 l Wasser pro Stunde eine große Menge an Nährstoffen und anderen Substanzen aufnehmen (Nordsieck, 2010). Durch ihre Funktion werden sie kontinuierlich Xenobiotika ausgesetzt, wodurch sie eine starke Schadstoffresistenz aufweisen müssen. Diese steht wahrscheinlich im Zusammenhang mit dem MXR-System, welches in den Kiemen der Muscheln identifiziert wurde und dort als „Umweltgewebeschanke“ dient (Kurelec, 1992; Luckenbach, 2008). Da das MXR-System in aquatischen Organismen eine bedeutende Rolle spielt, wurde dieses in den letzten Jahren vermehrt in der Muschel untersucht, weil sie einen beliebten Biomonitoring-Organismus darstellt. Daher wurden cDNA-Sequenzen für die MXR-Transporter von *M. californianus*, *M. edulis* und *M. galloprovincialis* identifiziert.

In den durchgeführten Experimenten wurden zwei verschiedene Aspekte der MXR-Transporter ABCB und ABCC untersucht. Einerseits sollten die vollständigen cDNA-Sequenzen der beiden MXR-Transporter einer zusätzlichen Miesmuschel *M. trossulus*, sowie ABCB von *M. edulis* identifiziert und mit den bereits bekannten MXR-Transporter-Sequenzen weiterer *Mytilus*-Arten auf Nukleinsäureebene verglichen werden. Bestehende Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten sollten durch eine verwandtschaftliche Distanz zwischen den untersuchten Arten sowie durch mögliche Unterschiede in der Stressanpassung beantwortet werden.

Es konnten cDNA-Sequenzen von ABCB und ABCC der *M. trossulus* und ABCB der *M. edulis* in dem Mitteldarmdrüsengewebe identifiziert werden. Jedoch konnte kein vollständiger ORF kloniert und sequenziert werden.

Der andere Fokus lag auf der Identifizierung von ABCB- und ABCC-Homologen der *Dreissena polymorpha*, welche als Vorlage für genetische Expressionsstudien dienen sollte. Dabei sollte festgestellt werden, inwiefern Chemikalien einen Einfluss auf die Expression von MXR-Transportern haben. Dazu wurden das Pestizid Dacthal und das umweltrelevante Schwermetall Quecksilber in seiner anorganischen Form als Modellschubstanzen gewählt. Weiterhin sollten toxische Effekte durch die Exposition mit Dacthal untersucht werden.

Durch bereits bekannte Sequenzen von ABCB und ABCC der *Dreissena polymorpha* konnten cDNA-Sequenzabschnitte für diese MXR-Transporter identifiziert werden.

5.1 STRUKTURELLE ANALYSE DER ABCB- UND ABCC- HOMOLOGE

Mit Hilfe der Taq-Polymerase konnten einzelne Sequenzabschnitte von ABCB der *M. trossulus* zu einem vollständigen ORF mit der Größe von 3895 bp zusammengesetzt werden, welcher bis zu 41 bp von der *M. galloprovincialis* (ORF=3900bp) und von *M. californianus* (ORF=3936 bp) abweicht. Trotz der unvollständigen bzw. fehlerbehafteten Nukleotidsequenzen der ABC-Transporter ABCB und ABCC von *M. trossulus* und *M. edulis* konnten durch die Übersetzung in die Aminosäuresequenz die charakteristischen Merkmale wie die Transmembrandomänen, Transmembranhelices und die Nukleotidbindungsdomänen mit den hochkonservierten Merkmalen identifiziert werden. Es konnten strukturelle Unterschiede zwischen den beiden MXR-Transportern nachvollzogen werden (Sarkadi, 2006). Außerdem wurden N-Glykolisierungsstellen in den ABCB- und ABCC-Homologen festgestellt, welche jedoch Unterschiede zwischen den vier untersuchten Miesmuschelarten aufweisen. *M. californianus* besitzt eine N-Glykolisierungsstelle weniger am NH₂-Terminus von ABCC im Gegensatz zu *M. galloprovincialis*, *M. edulis* und *M. trossulus*.

Die Taq-Polymerase besitzt jedoch eine hohe Fehlerrate während der Amplifizierung von PCR-Fragmenten, sodass keine weiteren Vergleiche auf Aminosäureebene durchgeführt wurden.

5.2 VERWANDTSCHAFTS-BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DEN VERSCHIEDENEN *MYTILUS*-ARTEN

Die *Mytilus*-Arten weisen eine antitropische Verteilung auf, da sie nur in kalten und wärmeren Gewässern, jedoch nicht am Äquator vorkommen. Dabei können sie in der nördlichen Hemisphäre durch genetische Untersuchungen in die vier Taxa *M. edulis*, *M. trossulus*, *M. galloprovincialis* und *M. californianus* untergliedert werden (Gèrard, 2008). Die drei Muschel-Arten *M. edulis*, *M. trossulus* und *M. galloprovincialis* gehören dabei zu den nah verwandeten „blue-mussels“. Durch mitochondriale DNA-Analysen wurde festgestellt, dass *M. californianus* am meisten von den anderen Arten abweicht (Martínez-Lage, 2002). Weiterhin besitzen die drei „blue mussels“ eine hohe morphologische Übereinstimmung, welches auf einen höheren Verwandtschaftsgrad schließen lässt als zu *M. californianus*. Durch Untersuchungen der MXR-Transporter auf Nukleinsäureebene konnte die beschriebene Verwandtschaftsbeziehung durch eine hohe Identität von 98% zwischen der *M. edulis* und *M. trossulus* für ABCB erkannt werden. Jedoch sollte dabei berücksichtigt werden, dass *M. edulis* mit *M. trossulus* und *M. galloprovincialis* durch die überlappenden Vorkommen, wie an der Ost- und Westküste des Atlantiks Hybride ausbilden können. Dabei wurde herausgefunden, dass in Skandinavien die Hybridisierung und Gen-Introgression so hoch ist, dass keine reinen *M. trossulus*-Arten mehr gefunden wurden (Riginos, 2005). Denn in so genannten „free-spawning“-Organismen ist nur eine geringe reproduktive Isolation möglich

(Miranda, 2010). Am meisten untersucht wurden dabei die Hybridzonen zwischen *M. edulis* und *M. galloprovincialis*. In den vorliegenden Untersuchungen wurde jedoch nur eine geringe Identität mit 93% zwischen *M. edulis* / *M. trossulus* zu *M. galloprovincialis* festgestellt, welches darauf beruhen kann, dass *M. galloprovincialis* in südlicheren Breitengraden als wie *M. californianus* vorkommt, welche eine Identität von 99% aufweisen.

Für das ABCC-MXR-Transportprotein wurde zwischen *M. edulis* und *M. galloprovincialis* ein sehr hoher Verwandtschaftsgrad identifiziert. Die Differenz zu *M. trossulus* und *M. californianus* kann darin begründet sein, dass *M. trossulus* und *M. californianus* sensibler auf Temperatur- und Salzkonzentrationsänderungen reagieren, als *M. galloprovincialis* und *M. edulis* (Braby, 2006). Weiterhin kommen die Arten *M. trossulus* und *M. californianus* in relativ sauberen Gewässern vor. Im Gegensatz zur *M. galloprovincialis*, welche häufig in stark belasteten Küstenregionen vorkommt. Außerdem weist *M. californianus* eine N-Glykolisierungsstelle weniger auf, welches eine reduzierte MXR-Transport-Effizienz zur Folge haben kann, jedoch nicht die Substratspezifität beeinflusst (Bard, 2000).

Resultierend aus den Ergebnissen kann vermutet werden, dass die *M. galloprovincialis* wahrscheinlich durch eine verstärkte „Pump“-Wirkung des MXR-Systems höhere Salzgehalts-Schwankungen, Temperaturänderungen und Schadstoffbelastungen tolerieren kann. Jedoch ist kein direkter Unterschied in der Struktur festgestellt worden. Die Ursache könnte auch in einer erhöhten Expression der MXR-Transporter oder in Unterschieden zwischen den detoxifizierenden Enzymen liegen (Stuckas, 2009).

5.3 BESTIMMUNG DER PRIMEREFFIZIENZ UND DIE SCHMELZPUNKTANALYSE

Für die Ermittlung der Primereffizienz durch die Standardkurven wäre es besser gewesen nicht nur eine Probe, sondern einen genetischen Pool aus allen Proben zu verwenden, da die Effizienz stark von der cDNA-Qualität und der in der Probe vorhanden Menge des Zielgens abhängig ist. Eine andere Möglichkeit wäre es, die Standardkurven mit Plasmiden oder aufgereinigten PCR-Fragmenten zu erstellen, damit der c_T -Wert der Proben innerhalb der c_T -Werte der Standardkurve liegt. Außerdem wäre der Einsatz einer Multikanalpipette vorteilhaft, um den Pipettierfehler so gering wie möglich zu halten und somit eine höhere Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu schaffen (Scholz, 2005). Die Primereffizienz und die Primerwahl sind als gut zu betrachten, da keine Störfaktoren durch Primerdimer oder andere PCR-Produkte neben dem Zielgen entstehen. Das Gen S3 wurde bei allen Behandlungen in etwa gleich stark exprimiert und eignet sich deshalb gut für die Verwendung als Referenzgen. Jedoch ist nach neueren Kenntnissen der Einsatz von mehreren Referenz-Genen ratsam, da so die Wahrscheinlichkeit eines möglichen Fehlers unterbunden wird (Holzapfel, 2007).

5.4 LARVEN VON *DREISSENA POLYMORPHA* ALS TESTORGANISMUS

Die Ergebnisse zeigen, dass Expositions-Versuche mit frühen Lebensstadien von *Dreissena polymorpha* kein gleichmäßig konstantes Testsystem ergeben, da die Reproduzierbarkeit hohen Schwankungen unterliegt. Es ist zu vermuten, dass die 24 Std. alten Larven sensibler gegenüber den untersuchten Stoffen reagieren, als wenn sie direkt nach der Befruchtung für 24 Std. inkubiert werden. Dies könnte durch einen zusätzlichen Test untermauert werden, indem die frisch fertilisierten Eier für 48 Std. der Substanz ausgesetzt werden. Dadurch könnte beobachtet werden, ob die Sensibilität von dem eingesetzten Larvenstadium abhängig ist oder ob es mit dem in einem höheren Zellstadium gebildeten Zilien in Zusammenhang steht. Vermutlich werden die Larven durch die Zilien und der daraus entstehenden Möglichkeit der Fortbewegung empfindlicher gegenüber Schadstoffen und auch der mechanischen Belastung während der Versuchsdurchführung. Denn die Wimpern besetzen die Kiemenblätter, Mantelflächen und Mundlappen und erzeugen einen gerichteten Wasserstrom, welcher das Wasser durch die Ingestionsöffnung einströmen und an den Kiemen und in die Mantelhöhle hineinragende Organe vorbeifließen lässt (Knor, 2010). Dadurch entsteht wahrscheinlich ein höherer Kontakt mit dem im Wasser gelösten Schadstoff, da dieser über Kiemen/Organe in den Kreislauf der Larve aufgenommen werden kann, obwohl in dem Larvenstadium noch keine Nahrungsaufnahme erfolgt, denn diese beginnt erst ab 48 Std..

Die Larven der neu gesammelten Muschelpopulation zeigten wahrscheinlich eine höhere Überlebensrate, weil diese Stress und viele verschiedene anthropogene Schadstoffe sowie natürliche toxische Produkte in der natürlichen Umgebung gewohnt sind. Durch die Haltung der älteren Population in ASTM-Wasser ist deren Antwortschwelle möglicherweise gesunken und reagiert deswegen empfindlicher auf Schadstoffe. Andererseits könnte auch die Qualität der Spermien und Eier während der längeren Haltung unter Laborbedingungen abgenommen haben, sodass die Fertilitätsrate unter 50% liegt. Aus diesen Gründen ist es besser mit frisch befruchteten Eiern einer gerade gesammelten Muschelpopulation zu arbeiten.

Daraus folgend ist es fraglich, ob das Testsystem Larven von *Dreissena polymorpha* für ein Labor- Testsystem für dauerhafte Versuchsdurchführung geeignet sind, da aus einer adulten Muschel nur einmal Sperma oder Eier gewonnen werden können und die Muschel dann verworfen werden muss. Außerdem ist das Laichverhalten stark jahreszeit- und temperaturabhängig.

Ein Vorteil hingegen ist, dass *Dreissena polymorpha* durch ihr invasives Verhalten sehr häufig vorkommt, sodass ausreichend Testorganismen für eine große Anzahl an Experimenten vorhanden sind.

5.5 TOXIZITÄT DES GETESTETEN TOXISCHEN SUBSTRATES DACTHAL

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass Dacthal neben dem Einfluss auf die Expression von MRP und P-gp auch eine Auswirkung auf die grundlegenden Prozesse im Organismus von *Dreissena polymorpha* hat, da Veränderungen in der Erscheinung hervorgerufen wurden und somit die Abnormalitätsrate zunahm. Jedoch waren keine lebenswichtigen Funktionen betroffen, da die Überlebensrate konstant blieb. Die prozentuale Betrachtung der Werte lässt erkennen, dass die Wahrscheinlichkeit für Fehlentwicklungen mit zunehmender Dacthalkonzentration ansteigt. Der Fisher's Exakt Test unterstützt die Vermutung, dass die Anzahl der Abnormalitäten in Abhängigkeit der Behandlung steht, wobei ein genereller Unterschied zwischen Kontrolle und Dacthal besteht, jedoch nicht innerhalb des Dacthals in unterschiedlichen Konzentrationen. Im Zusammenhang mit dem MXR-System kann die Ursache einer gleichbleibenden Überlebensrate in der Aktivität der ABC-Transporter liegen, welche eine schädigende Wirkung auf die Zellen vermeiden sollen (Luckenbach, 2008).

5.6 INDUKTION VON ABCB UND ABCC DURCH TOXISCHE SUBSTANZEN

Meeresorganismen sind kontinuierlich einer großen Bandbreite von im Wasser gelösten Schadstoffen ausgesetzt. Durch zelluläre Schutzmechanismen wird eine schädigende Wirkung auf den Organismus verhindert. Ein solches Schutzsystem besteht aus ABC-Transportern, welche eine Umwelt-Gewebeschanke in den Kiemen der Muscheln bilden. Dadurch ist es von besonderer Bedeutung zu untersuchen, durch welche Stoffe die MXR-Transporter induziert werden (Luckenbach, 2008).

Das MXR-System, die Expression von ABC-Transportern, kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden, wie chemische oder physikalische Stressoren. Um einen Effekt auf die Expression von den ABC-Transportern der Familie ABCB und ABCC auszuüben wurden keine physikalischen Stressoren, wie Hitze (Tutundjian, 2007), sondern chemische Stressoren Dacthal und anorganische Quecksilber verwendet.

In den Expressionsstudien wurde festgestellt, dass beide MXR-Transporter durch beide geteste Chemikalien induziert werden, wobei das anorganische Quecksilber den größten Effekt hervorrief.

Das Schutzsystem funktioniert, in dem die Akkumulation von Toxinen in der Zelle vermindert wird. Dabei steht die P-gp-Induktion immer im Zusammenhang mit der zellulären

Stressantwort (Eufemia, 2000). Diese Aussage kann mit den erlangten Ergebnisse unterstützt werden. In beiden Behandlungen wurden beide ABC-Transporter vermehrt exprimiert, wobei die Stärke von der Chemikalie und der verwendeten Konzentration abhängig ist.

Es ist bekannt, dass MRP Quecksilberkomponenten, wie auch Thiol-Konjugate durch die Funktion als „Efflux“-Protein eliminieren kann (Bosnjak, 2009). Jedoch wurde festgestellt, dass Quecksilber nicht nur ein Substrat von MRP ist, sondern auch die Expression von MRP und P-gp induziert (Eufemia, 2000; Tutundjian, 2007). Jedoch wurde auch MRP bei der Exposition mit Dacthal verstärkt exprimiert. Die Ursache, dass beide Chemikalien eine erhöhte Expression von beiden MXR-Transportern hervorrufen, könnte einerseits daran liegen, dass sich die Substratspezifität beider Transporter in diesem Fall überschneidet (Szakács, 2009). Andererseits wird die Expression von ABC-Transportern durch z.T. schnell erfolgende Veränderungen äußerer und innerer Bedingungen, wie Substratangebot, Stresseinfluss, Stoffwechselsituation und die Reaktion der Zelle auf physiologische (Hormone) und unphysiologische (Stress, toxische Faktoren) Einwirkungen hoch- oder abreguliert (Bielka, 1995). Eine Hochregulierung erfolgt als Stressantwort auf eine zelluläre Zerstörung durch zytotoxische Stoffe, wobei es egal ist, ob die Substanz ein Substrat ist oder nicht (Bard, 2000). Denn Quecksilber kann durch die Bindung und Depolymerisation von Tubulin-Filamenten Effekte auf zentrosomale Proteine ausüben und hat somit einen Einfluss auf die Mitose (Bosnjak, 2009).

Die Behandlungen von Dacthal und Quecksilber führten zu einer vermehrten Expression von MRP und P-gp in den Testorganismen, jedoch ist dabei unklar, inwiefern diese ausgelöst wird. Entweder können die Substanzen selber als Aktivatoren wirken oder durch die ausgelösten Prozesse hervorgerufen werden.

Ableitend ist festzustellen, dass Dacthal und anorganisches Quecksilber von *Dreissena polymorpha* als unerwünschte Substanzen erfasst werden, da die vermehrte Expression von ABC-Transportern, welche die erste Schutzlinie gegen toxische Substanzen bilden, die Antwort auf die Schadstoffeinwirkung ist (Epel, 1998). P-gp wurde generell höher exprimiert als MRP, auch in der Kontrolle. Es ist anzunehmen, dass P-gp in den Larven von *Dreissena polymorpha* eine höhere Bedeutung für das Schutzsystem hat als MRP, da keine organspezifische Untersuchung gemacht wurden, sondern die RNA aus der gesamten Larve extrahiert wurde.

Diese Experimente geben jedoch nur eine Aussage über die Wirkung auf genetischer Ebene. Sie geben keinen Hinweis darauf, ob die mRNA mittels Translation in die Aminosäuresequenz umgesetzt wurde und eine posttranskriptionale Modifizierung erfolgte.

Weiterhin können keine Rückschlüsse gezogen werden, ob Dacthal und Quecksilber nur die verstärkte Expression von P-gp und MRP hervorrufen oder ob diese auch als Substrate der untersuchten ABC-Transporter aus der Zelle geschleust werden oder als Inhibitoren wirken. Um diese Aspekte weiter erläutern zu können, müssten weitere Untersuchungen beispielsweise ein Calcein-, oder Rhodamin-Assay, sowie Westernblot-Analysen durchgeführt werden. Weiterhin sollte bei Biomonitoring-Untersuchungen beachtet werden, dass die Abwesenheit von P-gp nicht gleichbedeutend mit der Abwesenheit der toxischen Komponente ist (Bard, 2000).

Weiterhin ist zu berücksichtigen, dass der Nachweis des Zielgens nur indirekt gemessen wird, da nicht die Menge an mRNA, sondern die Menge an cDNA im Ansatz gemessen wird, welche aus der mRNA durch Reverse Transkription gewonnen wird. Dadurch kommt ein erheblicher Fehleranteil dazu, welcher einen Einfluss auf die Ergebnisse hat. Genauere Ergebnisse können mit dem *ribonuclease protection assay* erzielt werden, da hierbei die RNA quantifiziert wird (Mülhardt, 2009)

6 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Muscheln und andere aquatische Organismen benötigen auf Grund ihrer kontinuierlichen Schadstoffbelastung durch eine große Anzahl im Wasser gelöster Xenobiotika einen zellulären Schutz-Mechanismus. Diese Aufgabe übernimmt das *multixenobiotic resistance* (MXR)-System. Dieses System entsteht durch das Zusammenwirken verschiedener ABC-Transporter und detoxifizierender Enzyme, welche in ihrer Gesamtheit die Detoxifizierungsprozesse als Schutz vor der Akkumulation von potentiellen Schadstoffen in der Zelle übernehmen. Die bedeutendsten MXR-Transporter sind *P-glykoprotein* ABCB1 und das *multidrug resistance associated protein* ABCC1.

Unter Anwendung der Methoden RNA-Isolierung aus dem Mitteldarmdrüsengewebe, cDNA-Synthese, RT-PCR (*Reverse Transkriptase Polymerase chain reaction*), RACE-PCR (*rapid amplification of cDNA-ends-PCR*), Klonierung, Sequenzierung sowie der Bearbeitung und Analyse der erhaltenen Sequenzen sollten die vollständigen cDNA-Sequenzen für die MXR-Transportprotein ABCB und ABCC für *M. trossulus* und ABCB für *M. edulis* identifiziert werden. Aufbauend auf den ermittelten Sequenzen wurden Analysen hinsichtlich (1) ihrer Ähnlichkeit zu den *Mytilus*-Arten *M. californianus* und *M. galloprovincialis* sowie (2) charakteristische Strukturmerkmale von ABC-Transportern nachvollzogen.

Ein anderer Schwerpunkt der Arbeit lag in der Untersuchung der Expression von ABCB und ABCC in den Larven der *Dreissena polymorpha* in Abhängigkeit von den Umweltstressoren Dacthal und anorganischem Quecksilber durch die RT-qPCR (*reverse transkriptase quantitative PCR*). Dazu sollten (1) die cDNA-Sequenzen für ABCB und ABCC identifiziert werden und (2) Effekte auf die Expression der ABC-Transporter durch umweltrelevante Substanzen gekennzeichnet werden. Weiterhin (3) sollten toxische Effekte durch die Einwirkung von Dacthal ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die ABC-Transporter ABCB und ABCC in dem Mitteldarmdrüsengewebe von *M. trossulus*, *M. edulis* und *Dreissena polymorpha* exprimiert werden. In den erhaltenen cDNA-Sequenzen konnten charakteristische strukturelle Merkmale von ABC-Transporter nachgewiesen werden. Es bestanden hohe Ähnlichkeiten zwischen den vier *Mytilus*-Arten auf Nukleinsäureebene von 90-99%. Jedoch konnten aus den ermittelten MXR-Transportersequenzen keine Verwandtschafts-Beziehungen der *Mytilus*-Arten abgeleitet werden.

Um eine vollständige Analyse auf Nukleinsäureebene und Aminosäureebene realisieren zu können, ist es dringend notwendig, die vollständige cDNA-Sequenzen für ABCB und ABCC zu klonieren und zu sequenzieren, um den vollständigen ORF der MXR-Transporter zu

erhalten. Denn die Identifikation der Transmembran- und Nukleotidbindungsdomänen ist wichtig, um die Struktur, Funktion und den Transport-Mechanismus von MXR-Transportern aufzuklären. Weiterhin wäre es interessant zu erfahren, ob weitere Isoformen der MXR-Transporter ABCB und ABCC in den *Mytilus*-Arten exprimiert werden.

In den genetischen Expressionstudien von ABCB und ABCC der *Dreissena polymorpha* unter Schadstoffeinwirkung wurde festgestellt, dass beide Substanzen eine erhöhte Expression von den MXR-Transportern hervorrufen. Anorganisches Quecksilber erzielte dabei die höchste Expression, indem ABCB und ACC1 sechsmal höher als in der Kontrolle exprimiert wurde. Dadurch wurde die Aussage gestützt, dass diese umweltrelevanten Substanzen unabhängig davon, ob sie Substrate der ABC-Transporter sind, als Stressoren wirken und eine erhöhte Expression von ABC-Transportern als Stressantwort der Zellen hervorrufen. In dem Toxizitätstest wurde festgestellt, dass Dacthal mit zunehmenden Konzentrationen eine erhöhte Anzahl der fehlentwickelten Larven hervorruft.

Diese Versuche der Exposition der Larven der *D. polymorpha* gegenüber den untersuchten Substanzen sollten mehrfach ausgeführt werden, um bessere Daten für die statistische Auswertung zu erhalten. Weiterhin wäre es von Vorteil organisches Quecksilber, welches kein Substrat von ABCC ist, zu untersuchen, da es in den ökologischen Kreislauf aufgenommen wird und somit eine höhere Umweltrelevanz aufweist.

Literaturverzeichnis

- Alberts, B.,** Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M.: Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. (2005)- 3. Auflage
- Aller, S.,** Yu, J., Ward, A.: Structure of P-glykoprotein Reveals a Molecular Basis for Polyspecific Drug Binding. Science. Mar. (2009): 1718-22.
- Ambudkar, S.,** Kim, I.-W., Xia, D.: The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. FEBS Lett. Feb. (2006): 1049-55.
- Bard, S. M.:** Multixenobiotic resistance as a cellular defense mechanism in aquatic organisms . Aquat. Toxicol. Apr. (2000): 357-389.
- Baur-Kruppas, R.** < Robert@Korallenriff.de>: Meerwasser-lexikon. URL: < <http://www.meerwasser-lexikon.de>>, verfügbar am 10.06.2010
- Benton, M.,** Harper, D.: Introduction to paleobiology and the fossil record. Singapor: Wiley Blackwell. (2009)
- Bielka, H.,** Börner, T.: Rekombinante DNA-Technik (Gentechnik). In Molekulare Biologie der Zelle. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag. (1995)
- Biemans-Oldehinkel, E.,** Doeven, M.: ABC transporter architecture and regulatory roles of accessory domains. FEBS Lett. Feb. (2006): 1023-1035.
- Birnbaum, C.** <chbirnbaum@yahoo.com>: Invasive Alien Species Fact Sheet – Dreissena polymorpha. URL: <http://www.nobanis.org/files/factsheets/Dreissena_polymorpha.pdf> ,verfügbar am 12.11.2010
- Bosnjak, I.,** Uhlinger, K.: Multidrug Efflux Transporter Limit Accumulation of Inorganic, but Not Organic, Mercury in Sea Urchin Embryos. Environ. Sci. Technol. Nov. (2009): 8374-80.
- Braby, C.,** Somero, G.: Following the heart: temperature and salinity effects on heart rate in native and invasive species of blue mussels (genus Mytilus). J. Exp. Biol. Jul (2006): 2554-66.
- Bustin, S.A:** Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol. Oct. (2000): 169-93.
- Bustin, S. A.,** Benes, V., Garson, J.A.: The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. Clin. Chem. Apr. (2009): 611-622.
- Chaparro, O.,** Videla, J. A., Thompson, R. J.: Gill morphogenesis in the oyster Ostrea chilensis. Marine Biology. 199-207. Aug (2001): 199-207
- Chomczynski, P.,** Sacchi, N.: The single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction: twenty-something years on. Nat. Protoc. Jun (2006): 581-5

- Clark, D.:** Molecular Biology: Understanding the Genetic Revolution. London: Elsevier Academic Press. (2005)
- Clauss, W., Clauss, C.:** Zoologie für Tiermediziner. Stuttgart: Enke Verlag. (2005)
- Clontech Laboratories:** SMARTer RACE cDNA Amplification Kit. Benutzerhandbuch. (2010)
- Cole, S., Bhardwaj, G., Gerlach, J.:** Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science. Dec. (1992): 1650-4.
- Deeley, R. G., Westlake, C., Cole, S. P.:** Transmembrane Transport of Endo- and Xenobiotics by Mammalian ATP-Binding Cassete Multidrug Resistance Proteins. Physiol. Rev. Jul. (2006): 849-899.
- Endicott, J. A., Ling, V.:** The Biochemistry of P-glykoprotein-mediated multidrug resistance. Annu. Rev. Biochem. (1989): 137-71.
- Epel, D.:** Use of multidrug transporters as first lines of defense against toxins in aquatic organisms . Comp. Biochem. and Physiol. May. (1998): 23-28.
- Epel, D., Luckenbach, T.:** Efflux Transporters: Newly Appreciated Roles in Protection against Pollutants. Environ. Sci. Technol. Jun. (2008): 3914-20.
- Eufemia, N. A., Epel, D.:** Induction of the multixenobiotic defense mechanism(MXR), P-glycoprotein, in the mussel *Mytilus californianus* as a general cellular response to environmental stresses. Aquat. Toxicol. May. (2000): 89-100.
- Faria, M., Navarro, A., Luckenbach, T., Piña, B., Barata, C.:** Characterization of the multixenobiotic resistance (MXR) mechanism in embryos and larvae of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and studies on its role in tolerance to single and mixture combinations of toxicants. Aquat. Toxicol. Jan. (2011): 78-87.
- Feldstein, T., Nelson, N., Mokady, O.:** Cloning and expression of MDR transporters from marine bivalves, and their potential use in biomonitoring. Mar. Environ. Res. Jul. (2006): 118-21.
- Fent, K.:** Ökotoxikologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. (2007)- 3. Auflage
- Finnzymes:** Phusion High-Fidelity DNA Polymerase. Benutzerhandbuch. Jun. (2007)
- Flens, M. J., Zaman, G. J., van der Valk, P., Izquierdo, M. A., Schroeijs, A. B., Scheffer, G. L., van der Groep, P., de Haas, M., Meijer, C. J., Scheper, R. J.:** Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am. J. Pathol. Apr. (1996): 1237-47.
- Frohman, M. A., Dush, M. K., Martin, G. R.:** Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Dec. (1988): 8998-9002.
- Fuchs, G.:** Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag. (2007)- 8.Auflage

- Gavrilenko, A.:** Entwicklung einer Real-Time multiplex multitube RT-PCR zur Differentialdiagnostik der klassischen Schweinepest.-2006.-S.61. Hannover, Tierärztliche Hochschule, Dissertation, 2006
- Gérard, K., Bierre, N., Borsa, P., Chenuil, A., Féral, J. P.:** Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemisphere and strong genetic differentiation among southern population. Mol. Phylogenet. Evol. Oct. (2008): 84-91.
- Germann, U. A., Chambers, T. C.:** Molecular analysis of the multidrug transporter, P-glykoprotein. Cytotechnology. Sep. (1998): 31-60.
- Higgins, C. F.:** ABC Transporter: From Microorganisms to Man. Annu. Rev. Cell Biol. Nov. (1992): 67-113.
- Holzapfel, B., Wickert, L.:** Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Biologie in unserer Zeit. Apr. (2007): 120-126.
- Hooper, R., Hopf, A., Oh, C., Zhang, X., Adamec, J., Sepúlveda, M. S.:** Development of GCxGC/TOF-MS metabolomics for use in ecotoxicology studies with invertebrates. Aquatic Toxicol. Jun. (2008): 48-52.
- Huls, M., Russel, F. G., Masereeuw, R.:** The Role of ATP Binding Cassette Transporters in Tissue Defense and Organ Regeneration. J. Pharmacol. Exp. Ther. Jan. (2009): 3-9.
- Innes, D. J., Bates, J. A.:** Morphological variation of *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in eastern Newfoundland. Marine Biology. Jan. (1999): 691-699.
- Invitrogen:** TA Cloning Kit. Benutzerhandbuch. Jul. (2004)
- Invitrogen:** Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit. Benutzerhandbuch. Apr. (2006)
- Karp, G.:** In Molekulare Zellbiologie. Berlin: Springer Verlag. (2005)
- Knor, A.** < andrea.knor@gmx.de > : Muscheln(Bivalvia). URL: < http://www.uni-duesseldorf.de/MathNat/Biologie/Didaktik/Wattenmeer/4_tiere/dateien/muscheln.html>, verfügbar am 26.09.2010
- Kuo, M. T.:** Roles of Multidrug Resistance Genes in Breast Cancer Chemoresistance. Adv. Exp. Med. Biol. (2007): 23-30.
- Kurelec, B.:** The multixenobiotic resistance mechanism in aquatic organisms. Crit. Rev. Toxicol. (1992): 23-43.
- Locher, K. P.:** Review: Structur and mechanism of ATP-binding cassette transporters. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. Jan. (2009): 239-45.
- Löscher, W., Potschka, H.:** Blood-Brain Barrier Active Efflux Transporters: ATP-Binding Cassette Gene Family. NeuroRx. Jan. (2005): 86-98.

- Luckenbach, T., Epel, D.:** ABCB- and ABCC-type transporters confer multixenobiotic resistance and form an environment-tissue barrier in bivalve gills. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. Jun. (2008): 1919-29.
- Luckenbach, T., Epel, D.:** Nitromusk and Polycyclic Musk Compounds as Long-Term Inhibitors of Cellular Xenobiotic Defense Systems Mediated by Multidrug Transporters. Environ. Health Perspect. Jan. (2005): 17-24.
- Luedeking, A., Koehler, A.:** Regulation of expression of multixenobiotic resistance (MXR) genes by environmental factors in the blue mussel *Mytilus edulis*. Aquat. Toxicol. Jul. (2004): 1-10.
- Leslie, E. M., Deeley, R. G., Cole, S.:** Multidrug resistance proteins: role of P-glykoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol. Appl. Pharmacol. May. (2005): 216-37.
- Martínez-Lage, A., Rodríguez, F., González-Tizón, A., Prats, E., Cornudella, L., Méndez, J.:** Comparative analysis of different satellite DNAs in four *Mytilus* species. Genome. Oct. (2002): 922-9.
- McFadzen, I., Eufemia, N., Heath, C., Epel, D., Moore, M., Lowe, D.:** Multidrug resistance in the embryos and larvae of the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Environ. Res. Jul. (2000): 319-23.
- Miranda, M. B., Innes, D. J., Thompson, R. J.:** Incomplete reproductive isolation in the blue mussel (*Mytilus edulis* and *M. trossulus*) hybrid zone in the Northwest Atlantic: role of gamete interactions and larval viability. Biol. Bull. Jun. (2010): 266-81.
- Mülhardt, C.:** Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. (2009)- 6.Auflage.
- Nolan, T., Bustin, S.:** Article 4: Optimisation of the PCR step of a qPCR assay. European Pharmaceutical Review Issue. (2009): 15-20.
- Ohara, O., Dorit, R. L., Gilbert, W.:** One-sided polymerase chain reaction: The amplification of cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Aug. (1989): 5673-5677.
- Parker, M. T.:** Brock Mikrobiologie. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH. (2001)- 2. Auflage
- Projekt, R. < unbekannt > :** Zebra Mussel life cycle. URL: < http://www.siue.edu/OSME/river/ZebraMussel/zebra_mussel_life_cycle.htm>, verfügbar am 12.10.2010
- Promega:** Usage Information GoTaq Flexi DNA Polymerase. Benutzerhandbuch. (2008)
- Rey, P. <k.mohr@hydra-institute.com>:** Gewässermonitoring. URL: <<http://www.hydra-institute.com/de/ifah/Gewaesseroekologie/Aquatische%20Neozoen.php>>, verfügbar am 12.06.2010
- Riginos, C., Cunningham, C. W.:** Local adaptation and species segregation in two mussel (*Mytilus edulis* x *Mytilus trossulus*) hybrid zones. Mol. Ecol. Feb. (2005): 381-400.
- SABiosciences:** Real-Time PCR for Systems Biology. SABiosciences. (2008): 14-16.

- Saiki**, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A.: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. Science. Jan. (1988): 487-91
- Sanger**, F., Nicklen, S., Coulson, R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. Biotechnology. Dec. (1992): 104-8.
- Sarkadi**, B., Homolya, L., Szakács, G., Váradi, A.: Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. Physiol. Rev. Oct. (2006): 1179-1236.
- Schneider**, E.: ABC-Transporter: Eine Proteinfamilie für den Transport chemischer verbindungen über biologische Membranen. Biochemie. Wiley-VCH Verlag GmbH. (2000): 90-99.
- Scholz**, S.: Guidelines for qPCR. Leipzig: Anleitung Helmholtz-Zentrum Leipzig. Sept. (2005)
- Smital**, T., Kurelec, B.: The chemosensitizers of multixenobiotic resistance mechanism in aquatic invertebrates: a new class of pollutants. Mutat. Res. Mar. (1998): 43-53.
- Smital**, T., Sauerborn, R., Pivcević, B., Krca, S., Kurelec, B.: Interspecies differences in P-glycoprotein mediated activity of multixenobiotic resistance mechanism in several marine and freshwater invertebrates. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. Jun. (2000): 175-86.
- Storch**, V., Welsch, U.: Kükenthal- Zoologisches Praktikum. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. (2009)- 26. Auflage
- Stuckas**, H., Stoof, K., Quesada, H., Tiedemann, R.: Evolutionary implications of discordant clines across the Baltic Mytilus hybrid zone (Mytilus edulis and Mytilus trossulus). Heredity. Aug. (2009): 146-56.
- Szakács**, G., Kin Wah, K., Polgár, O., Robey, R. W., Bates, S.: Multidrug Resistance Mediated by MDR-ABC Transporters. Drug Resistance in Cancer Cells. (2009): 1-20.
- Tutundjian**, R., Minier, C.: Effect of temperature on the expression of P-glycoprotein in the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Journal of Thermal Biology. Apr. (2007): 171-177.
- VanGuilder**, H. D., Vrana, K. E., Freeman, W. M.: Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. Bio.Techniques. Apr. (2008): 619–626.
- Wildlife**, M. <unbekannt> : Zebra Mussel Life History. URL: <http://www.mass.gov/dfwele/dfw/nhesp/conservation/invasives/invasive_zebra_mussel_life_history.htm>, verfügbar am 08.09.2010
- Zähringer**, H.: RNA-Kopiensammler. Laborjournal. May. (2010)5: 57-60.
- Zilinskiene**, J.: certificate of Analysis: RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transkriptase. Fermentas Life Sciences. Sept. (2008)
- Zucchi**, S., Corsi, I., Luckenbach, T.: Identification of five partial ABC genes in the liver of the Antarctic fish Trematomus bernacchii and sensitivity of ABCB1 and ABCC2 to Cd exposure. Environ. Pollut. Aug. (2010): 2746-56.

Anlage 1

Nukleotidsequenzen

Mytilus edulis ABCB

AGTAATGACAGAATAGCCTCAATAGGTGTTATATTAAGAAAACCAGATGG
ACCTCCCCCAGCCACACTGGGACAATTGTTCCGCTATGCTACAAGTGTGG
ACATAATCTGTATCCTGTTTGGTTCCCTGTTTTCACTTGCTCATGGAGCA
GGATGGCCGGTATTGTCCATCGTTATGGGACAGATGACAGATACTTTTGT
AGCAGGACCAAATGGATCGTTGATACCTCCAGGCCCTAATGCCACACACA
ATCCTAATGTTACTGTAGAATCTTTTGAAGACAAGATGACAACATATGCA
TTATATTACTTAATCATTGGTGGAGTAGTACTACTCTCTGGTTATTTACA
GATCGCCTGTTTTATGACAGCCTGTGAGAGACAAGTAAACAAGATTAGAA
AACAATTTTTCCAAGCCATATTACGTCAGGAAATTGGCTGGTTTGATAAA
CATCAGAGTGGTGAAGTACCAACCAGATTATCTGATGATTTAGAAAGAGT
GAGAGAAGGCATCGGAGATAAGCTAAGTCTTTTGATACAGTTCGTAGCTC
AGTTTTTTGCTGGATTGTCATTGGATTTTATAAAAAGTTGGAATATGACG
TTAGTTATGATGTCACTGACACCTCTACTGGCCATTCTGGGTGGTTATTT
CTCAGGACTGATGCAAAACTTTGCGAAAAGAGAAACAAGCCTTATATGCTG
ACGCTGGAAGTGTAGCAGAAGAAGTTATATCTTGTATGAGAACTGTGGTA
TCATTTAATGGTCAAAAACAGGAAGTGAAAAGATACGGAAAATCTTTGGA
AGAAACAAAACAAATAGGGATAAAGAAATCCATGGTAACTGGTTTGTTC
TTGGTAGTTTATATCTTGTGATGTTTGGAGATTATGCACTGTCATTTTGG
TATGGAAATGAACAAGTAAAAAATTCATAACATCTAACGGAGAAGATGG
TATCACACCTGGTACAGTCCTCACAGTATTTTTCTGTGTAATGATTGGTA
GTTTCTCAATAGGAAATGCAGCACCAAACATTGGTTCCTTTGTAACAGCC
AAAGGGGCTGCAGCTGTTGTGTATGAAATCATTGACAGAAAACCAAAAT
TGATGCCAGTTCTGAGAAAGGACAACGCCCCTGTCAATACAAGGAGCAT
TACAGTTTCTTGGTGTGAATTTTACTTATCCTACTAGAGAAGATGTACAG
GTGCTGACTAATTTTAACCTGTGATAAAACCTGGACAACTGTAGCTTT
GGTAGGATCCAGTGGGTGTGGTAAATCTACCATAGTTAATCTCATAACAG
GGTTCTACGACCCAGATGCAGGACAGGTTTTTACTAGATGGTAACAACATA
AAAGATTTAAATTTGAACTGGTTACGACAGAACATTGGTGTGGTATCGCA
GGAACCACTCTTGTGTTGGTTGCACCATAGCCGAGAACATTTCGACTAGGGA
ATCCGAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAAGCAGCCAAACAAGCCAAC
GCACATGACTTCATAAAAAAGTCTTCCTCAGAGTTACAACACACTAGTTGGA
GAGCGTGGAGCTCAGTTATCAGGAGGACAGAAACAACGAGTAGCCATTGC
CAGAGCTTTGATAAGAGACCCAAGAATCCTGTTACTGGATGAAGCTACAT
CTGCATTAGACTCTGAGAGTGAGAACATTGTACAGGAAGCTCTAGAAAAG
GCAAGACAGGGAAGAACAACCTTGGTGATAGCACACCGCCTGTCCACCAT
ACAGAAAGCAGACATTATATATGTGGTGGATAAAGGAGAGATTATAGAAC
AGGGAACCTCATGGTGACCTGATGGACAAACAAGGACTGTATCATTCCTG
GTTACTGCACAGACATTGGTTAATGAAGATGCAGCTGAGTCAGCACTAGA
GGAGGATGAGGAAGAGGAGGCTGTAGATACTGTCCCAGATCAAACAGTTA
AACGATCAAGATCAAGAATCAAATCTACTTCATCAGATGACAAATCACCA
CAAAAATTGTCTCGACAACTCTCCCGACAGACATCAGGACTGTCTGATGG
GAAGGACAAAACCTGACAAAGAGGAGGAGCCTGAAGAACAAGAAGAATATG
AACCACCGAGGTACTTCCGTATGATCCATGAAAATCAACCAGAATGTGGA
TTTATTGTGCTTGGGATTATGGCATCTTGTGTGCTGGATGTACGATGCC
AGCATTTGCTATATTCTTTGGAGAAAATGATTAAAGGTATTTATAGAGCTAG
GAAATAATGGACTTTTTATGGAGCATGATGTTTTTGGCACTTGGAGGAATA
AACTTTCTGGTCTATTTTGTACAGGCTTCTAGTTTTTGGTATATCTGGTGA
GAGATTAACCCAGCGACCCAGACTCGGTACATTTAATGCCTACATGAGAC
AAGATATAGCTTTCTATGATGACAAGTTCCTACTCCACTGGAGCTCTAACA

ACTAGACTGGCTACGGATGCATCCTTAGTTAAACAGCAACAGGTGTGAG
AATTGGAATGGTTTTCCAGTCAATGTTTGGACTGGTAGCAGCCCTGGTTA
TAGCCTTTTATTATGGGTGGGCTCTAGCTCTTGTTGTACTTGGTATTGTA
CCAATAATTGGTTTTGCAAGTAGCCTACAGATAAAAAGTTTTGAAGGGAAG
ACATGAGGAAGATAAAAGGAAAAC TAGAGGAGGCTGGGAAGACAGCTGCAG
AACTATTGAGAATATCAGAACTGTCCAGTCCTTGACCACAGAGAAACAT
TTCTATCACGAATATTCGCATTCTCTTGTTGGGACCACTCAGATCCATGAT
AAAGCAAGCCCACTGGTATGGAATAGCATTGTTTGGTTTAGGTCAAGGTGTTA
TCTTCAYGACCTATGCTGGTGCCTTTAGATTTGGTGCATGGCAAGTGGAG
ATAGGAGAAATGACAGCTGATAATGTGTTCAAAGTCTTCTTTGCCATTGC
CTTTACTGCCATGGTGATTGGACAATCATCCTCATTCTGCCAGAGTATT
CAAAGGCCAAACATGCTGCTGGATTGATTTTCAAAGCATTGACACTGTA
CCCTCTATAGATATATACTCCAAAAGGGGAACCTTATCTGCAAAAAGTGGA
TGGTTTGATACAGTTTAAAGATGTCAATTTCTGTTACCCAAC TAGACCAG
AGGTAAAGGTCTTGAAAGGAGTGAATATGAAGGTGGAGCCAGGACAGACT
GTGGCTCTTGTTGGGACAAAGTGGGTGTGGCAAGTCTACAGTTATCTCCCT
TTTACAGAGATTCTATGATCCTGAGTCAGGGGAAATTATGATAGATGGTA
TAGATATAAAAGACCTACATCTTCACAAAATGAGGTCATTTATTAGTGTR
GTCAGTCAAGAACCGATCCTGTTCAATTGTAGTATCAGTGACAACATAGC
TTACGGTCTGGAGGAAACTGCAGGGATGGATGATGTTATTGCTGCTGCTC
GRGATGCTAATATTCATGAGTTTATTACTAGTCAGCCAATGGGTATGAC
ACAATAGTTGGTGAGAAGGGGACACAACTGTCTGGTGGACAGAAGCAGCG
TGTTGCCATAGCAAGAGCTTTGATTAGGAATCCCCAAAATTCTCTTGTTAG
ATGAGGCTACATCAGCATTAGATT CAGAGAGTGAAAAGTTTRGTACAAGAA
GCATTAGACAAAGCACAGAAGGTCGTACGTGTATTGTGATAGCCCATCG
TCTTTCTACGATTCAGAATGCTGATGTGATCTTTGTAATGGACAGTGGCG
CCATCGTAGAAAGTGGTACACACCAGACTCTCTTAGCGAAGAAAGGAGTG
TACAATTCGTTAGTTAGTGCACAGCAGTTTATAAAAATAG

Mytilus trossulus ABCB

ATGAGTAAAAGCGAAGAGAGAAAAACCTCTCCTGGCTGACGACGAGCAGGA
ATCATACACAGGCAGCAGTAAGAAGAAGGACAAAGAAAAGATAGAACCAG
ATGGACCGTCCCCAGCCACACTGGGACAATCGTTCCGCTATGCTACATGT
GTGGACACAATCTGTATTGTGTTTGGTTCCTTGTTTTCACTCGCTCATGG
AGCAGGATGGCCGGTTTTGTCCATTGTTATGGGTCAGATGACAGACACTT
TTGTAGCAGGACCAAATGGCTCCTTGATACCTCAAGACCCTAATGCCACA
CACAATCCTAATGTTACTGTAGAATCGTTTGAAGATAAGATGACCACATA
TGCTTTTATACTACTTAATCATTGGTGGAGTAGTACCACTCTCTGGTTATT
TACAGATTGCATGTTTTATGACAGCCTGTGAGAGACAAGTAAACAAGATT
AGAAAACAATTTTTCCAAGCCATTTTACGTCAAGAGATTGGCTGGTTTGA
TAAACATCAGAGTGGTGAAC TGACCACCAGATTATCTGATGATTTAGAAA
GAGTGAGAGAAGGAATTGGAGACAAGCTAAGTCTTCTGATACAGTTTCGTA
GCTCAGTTTTTTTGCTGGATTTGCCATTGGATTTTATAAAAAGTTGGAAGAT
GACCTTAGTTATGATGTCAC TGACACCTCTACTRGCCATTCTGGGTGGTT
ATTTCTCAGCACTGATGCAAACTTTGCCAAAAGAGAACAAAGCCTTATAT
GCTGATGCTGGAAGTGTAGCAGAAGAAGTTATATCCTGTATGAGAACTGT
GGTATCATTTAATGGTCAAAAACAGGAAGTCAAAAGATACGGAAAATCTT
TGGAAGAAAACAAAACAAATAGGTATAAAGAAATCTATGGTAACTGGTTTG
TTGCTTGGTAGTTTATACCTTGTGATGTTTGGAGATTATGCACTGTCATT
TTGGTACGGAAATGAACAAGTCAAAGAATACATTACATCTAACGGAGCAG
AGGGTATCACACCTGGAACAGTCCTTACAGTATTCTTCTGTGTAATGATT
GGTAGTTTCTCAATAGGAAATGCAGCACCAACATTGGTTCCTTTGTAAC
AGCCAAAGGGGCTGCAGCTGTTGTGTATGAAATCATTGACAGAAAACCAG
AAATAGATGCCAGTTCTGAGAAAGGACAACGCCCACTGTCAATACAAGGA
GCATTACAGTTTCTTGGTGTGAATTTTACTTATCCTACTAGAGAAGATGT
ACAGGTGCTGACTAATTTTAACTGTGATAAAACCTGGACAACTGTAG
CTTTGGTAGGATCCAGTGGGTGTGGTAAATCTACCATAGTTAATCTCATA
CAGAGGTTCTACGACCCAGATGCAGGACAGGTTTTACTAGATGGTAACAA
CATAAAAGATTTAAATTTGAACTGGTTACGACAGAACATTGGTGTGGTAT
CGCAGGAACCAGTCTTGTTTGGTTGCACCATAGCCGAGAACATTTCGACTA
GGGAATCCGAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAAGCAGCCAAAACAAGC
CAACGCACATGACTTCATAAAAAGTCTTCCTCAGAGTTACAACACACTAGT
TGGAGAGCGTGGAGCTCAGTTATCAGGAGGACAGAAACAACGAGTAGCCA
TTGCCAGAGCTTTGATAAGAGACCCAAGAATCCTGTTACTGGATGAAGCT
ACATCTGCATTAGACTCTGAGAGTGAGAACATTGTACAGGAAGCTCTAGA
AAAGGCAAGACAGGGAAGAACAACCTTGGTGATAGCACACCGCCTGTCCA
CCATACAGAAAGCAGACATTATATATGTGGTGGATAAAGGAGAGATTATA
GAACAGGGAAC TCATGGTGACCTGATGGACAAACAAGGACTGTATCATTC
ACTGGTTACTGCACAGACATTGGTTAATGAAGATGCAGCTGAGTCAGCAC
TAGAGGAGGATGAGGAAGAGGAGGCTGTAGATACTGTCCCAGATCAAACA
GTTAAACGATCAAGATCAAGAATCAAATCTACTTCATCAGATGACAAATC
ACCACAAAATTTGTCTCGACAACCTCTCCCGACAGACATCAGGACTGTCTG
ATGGGAAGGACAAAAC TGACAAAGAGGAGGAGCCTGAAGAACAAGAAGAA
TATGAACCACCGAGGTACTTCCGTATGATCCATGAAAATCAACCAGAATG
TGGATTTATTGTGCTTGGGATTATGGCATCTTGTGTCGCTGGATGTACGA
TGCCAGCATTTGCTATATTCTTTGGAGAAATGATTAAGGTATTTATAGAG
CTAGGAAATAATGGACTTTTTATGGAGCATGATGTTTTTGGCACTTGGAGG
AATAAACTTTCTGGTCTATTTTGTACAGGCTTCTAGTTTTTGGTATATCTG
GTGAGAGATTAAACCCAGCGACCCAGACTCGGTACATTTAATGCCTACATG
AGACAAGATATAGCTTTCTATGATGACAAGTTCCACTCCACTGGAGCTCT
AACAACTAGACTGGCTACGGATGCATCCTTAGTTAAAACAGCAACAGGTG
TGAGAATTGGAATGGTTTTCCAGTCAATGTTTGGACTGGTAGCAGCCCTG
GTTATAGCCTTTTATTATGGGTGGGCTCTAGCTCTTGTTGTACTTGGTAT

TGTACCAATAATTGGTTTTGCAAGTAGCCTACAGATAAAAGTTTTGAAGG
 GAAGACATGAGGAAGATAAAGGAAAAGCTAGAGGAGGCTGGGAAGACAGCT
 GCAGAACTATTGAGAATATCAGAACTGTCCAGTCCTTGACCACAGAGAA
 ACATTTCTATCACGAATATTCGCATTCTCTTGTGGGACCACTCAGATCCA
 TGATAAAGCAAGCCCACTGGTATGGAATAGCATTGTTTTAGGTCAAGGT
 GTTATCTTCATGACCTATGCTGGTGCCTTTAGATTGTTGGTGCATGGCAAGT
 GGAGATAGGAGAAATGACAGCTGATAATGTGTTCAAAGTCTTCTTTGCCA
 TTGCCTTTACTGCCATGGTGATTGGACAATCATCCTCATTCTGCCAGAG
 TATTCAAAGGCCAAACATGCTGCTGGATTGATTTCAAAGCATTGACAC
 TGTACCTCTATAGATATATACTCCAAAAGGGGAACTTATCTGCAAAAAG
 TGGATGGTTTGATACAGTTTTAAAGATGTCAATTTCTGTTACCCAACTAGA
 CCAGAGGTAAAGGTCTTGAAAGGAGTGAATATGAAGGTGGAGCCAGGACA
 GACTGTGGCTCTTGTGGGACAAAGTGGGTGTGGCAAGTCTACAGTTATCT
 CCTTTTACAGAGATTCTATGATCCTGAGTCAGGGGAAATTATGATAGAT
 GGTATAGATATAAAAGACCTACATCTTCACAAAATGAGGTCATTTATTAG
 TGTAGTCAGTCAAGAACCGATCCTGTTCAATTGTAGTATCAGTGACAACA
 TAGCTTACGGTCTGGAGGAACTGCAGGGATGGATGATGTTATTGCTGCT
 GCTCGGGATGCTAATATTCATGAGTTTATTACTAGTCAGCCAATGGGTTA
 TGACACAATAGTTGGTGAGAAGGGGACACAACCTGTCTGGTGGACAGAAGC
 AGCGTGTGGCCATAGCAAGAGCTTTGATTAGGAATCCCAAAATTCTCTTG
 TTAGATGAGGCTACATCAGCATTAGATTCAGAGAGTGAAGGTTAGTACA
 AGAAGCACTAGACAAAGCACAAGAAGGTCGTACGTGATTGTGATAGCCC
 ATCGTCTTTCTACGATTGAGAATGCTGATGTGATCTTTGTAATGGACAGT
 GGAGCCATCGTAGAAAGTGGAACCCACCAGACTCTCTTAGCTAAGAAAGG
 GGTATACAATTCTTTAGTTAGTGCCAGCAGTTTATAAAATAG

Dreissena polymorpha Larve ABCB

CAGATTCTCATTGACGGGGTGAATCTCAAGGACATCAATCTGAAGTGGTGGCGGGAAAATATTGGCAT
 CGTGAGCCAGGAACCAAGTGCTGTTTGGAAACAACGATAGAGGAAAACATCCGCTATGGGCACCTGGACG
 TTACCAAAGAAGATATAGAACAGGCGGCCAAGATGGCCAATGCACATGACTTCATCATGGATTGCCA
 CAGAAATATGAGACGCTGGTTGGTGAGCGGGGTGCCAGCTGAGCGGTGGGCAGAAGCAGCGTATTGC
 CATCGCCCAGCCCTTGTGCGCAATCCCAAGATCCTCCTGCTGGACGAGGCCACGTCAGCACTAGACA
 CAGAGAGCGAGGGGATTGTACAGGATGCACTTGAAAAGGCTAGTCATGGAAGGACCACCATTGTTATA
 GCTCACCGCCTTTCCACCATCAAGACAGCTGACATGATCGCTGGCTTCAAAGATGGCGTCGTGGCGGA
 ACAGGGCACCCACACTGAACTGATGAGCAAACATGGCATCTACCAACAACCTAGTCACTYTTTCAGAGTA
 TGAAAAGTGCTGATGATGATGACATTGAAAATTTCAACAGAGATGACACAAAACGACCGTCGTAAAC
 CATCAGAAGAGCAYAATAGACATGACTCCGAAAAGCATGCCCACGRT

Mytilus trossulus ABCC

ATGGATTACAATCTTTTCGGTATGCAATACACAGTTTGTAGTGACAAGATTTCGGTCACAGTAGTAGAGGG
GTCATATTTAGCAGCATGGACACCTGTGTTGTTTGTGTTTAGCAGCGCCTATCAACTTTGTCTATTTCA
CACACAATTTACAAGCAGCTGTTGTCCAGTACAAATTCATTTTAGCAATATTCATCACACTATTAGGC
GTACTAAGCTTATCAATTGGACTGAGAGATATTCATGACGTTTTGTTTGGAGAAAAGTCTCCTGATGG
TTTAATTTTATCAATTAGTGTAGTTTTGACAACGATATTGATACAAGATGAATCTCATAAAACACAGA
GGAAGAAAAAGAGAAATTTAGAGGTTTCCAAATATTTGGACTTTTCTTCAGTTTGGGAATTTCTGTTG
GCATATATTTTTTCATAAACGAAAAGATACTAATGTTGATAATAACTGGGAAACACAATAACAGAGTG
GAACACAAAACCTGTATTGTGTGCTGATATGTGTGTACCTAATAGAATCAGTAATACCGGGTTTAAAC
AGGTTCTGGGAATAAACAGTCTTTTGAAAAGGGTAAAGCAGACAAAGACGTTTCTCCAGAAGGAAAT
GCATCTTTTTTGTACGCTCACCTGGAGTTGGGTAAACGCCATTTGTACTGTATGGATATAAACATAA
TATCGAACCATCAGATTTATGGCCCTTAAACCTGAACATATATCTACAAATATCATTCTATTTTCG
ATAAGTACTGGGAAGAGGAGGTAGAGAAAGCTGCACGAGAGAGGCAATCCCAAGGAAAGCGAACGATT
AAGACAACACCAATTACTGTTGAGAAAAAGTTTCAGGCAAACCTCCTCCGTTGTGTTATAAGAGCATC
GGGGCCTGCTGTGTTGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ATATGATAAGACTCCTAATTGGCATAGCAAGAGATGGAAAAGAAGAGATCTGGAAAGGTTACATACTT
GCTGTCTTATGTTTTCTGTCTCAATATTCAAATCCGTTGTTTTGAACATTCATATTAATGGAACACA
AGAAGCAGGAAGGAGTAAGTGGGTAGCTCTTACTGGTGCCATTTATAAAAAGACTCTGAGACTTACTA
ATGCAGCTAAGCAAGATTCTACTGTAGGCGAGATCATCAACTTGATGTCTGTTGATGCTGAAAAGATA
GGACATTGTATGTGGAGTGTGAATGATGTATGGGCCGTTCTCTCTTATTTTCAATATCTTTTTACTT
CCTGTGGCAAACCTTAGGACCCCTCAGTCTTTAACAATGGTAGATGGCCGAATCGGAGAAATAGGATCA
TCTGATGAAATCACTGAACACGACGGATCTTTTGCAGGATTCATGAAAAATTATTTGGCGGAAGA
GAGTTCTGATGATGAACAAAACATAGTTTTCGCACAGACCATTAGAAAGAATCCCCACAACCTGACGAGA
CAATCATCCATAGTACACATTCAGATATTGTACACAGTATAAGTGATAATTCAAATATACCAATAGCC
AGACAGATGTCACGACAGATGTCACGACAGACTTCATGTGAGAGCGAGTCGTCAGAAGTTTTGTTGCA
TAATACATTGGTACAGGATGAGAATACAGAGTCAGGATCGGTCAAATTAAGCGTGATTATGACCTATG
CAAGAGCTGTTGGCTTTAAGATTGTAATAGTTATATTAACAATGAGTATGGTTCATGAACCTTGCGGAG
ATGTATTTAGATGTATGGCWTAGTAAATGGACACAAGAYCATACAAACRGAACAGMTAATGAACTCA
AAGAAACAKGAGACTTGGARTTTATGGAGCTATAGGACTTTTTAGAGGTGTGTCAATCTKTATTACGG
AAACCTTTGTTACTTATGGACTGATAAAGGCAACWAGAAAACCTCCATAAAGATTTGTTACGTAAACATY
YTGAGATCACCAATGAGTTTTTTTCGATACCACACCGGTAGGCAGGATTGTAAAYCGGTTCTCGAAGGA
TATAGAAACYATAGACGACGAACCTGATCTACCAGTTTAAAGACGTGGTCATATGTCTGTTATTAGTTT
TGTGTAATACAGTCATCATTAGCACYGGGACACCTCAGTTCTTATTTATAATGCTTCCAGTMAYGGTT
GTGTATTCKGCTTACAGCGCTTGTACGTCTCAACATCTCGACAGTTAAGGACGATGGCATCATCGGC
TCGATCCCCTATATTTTACATTTTGGAGAAACCATTTCTGGATGTTCCACAATCCGGGCCTTTCAAC
AGGAGAAAACGATTTATGACTGAATCAGCACGTCGATTTGATGAACTCAATACTCGGCGTTCTCTTGCA
CGATCAGTCGAAAAATGGTTACATATCCGACTAGACTGGTTAGGAAGCATTATAGTGTGTGTGTTG
CTTGCTAGTTGTAGTAAATAAGGATGATATCTCTCCAGGGATAGTTGGTTTGGCCATTACGTATGCTT
TGAATGTGACCAATTGCATCGAATGGTTGGTAAAAATTAACAACGAATGCAGAAACGAATATTATATCT
CTAGAGAGAATCCAAGAATACTCAGAAACACCTACAGAGGCTGAATGGGTAGTGGAACCTAAAAGACC
AGAACATGATTGGCCAAATGAAGGAAACGTTGAGTTTGATAATTATGGTGTTCGCTATAGGGAAGGTC
TTGAATTAGTTTTGAAAAGCATAACATGTAAAATAGCTCCATGTGAAAAGATTGGTATTGTTGGTTCGA
ACAGGAGCTGGGAAGTCCCTATTAAACCATGGGCTTGTTCAGAATTATAGAAAAAGCTCAAGGACGGAT
CATTATAGATGGTATCGATATTTCTACGATAGGACTTCATGATCTGAGATCAAAGATAACTATCATAC
CACAGGACCCTGTTTTGTTTTCTGGAACAATGAGAATGAACCTGGATCCGTTTGATGAATACTCTAAC
GAGGACATCTGGACAGCCCTCAACCATGCACATCTGAAAGCCTTTGTGATTGGTTTAAAAGATGGACT
GGATTACCGTTGTTCTGAAGGGGGAGATAATCTAAGTGTGGTCAACGACAATTAATCTGTCTTGCCA
GAGCCTTACTAAGAAAGACTAAAATTTTAGTTCTTGATGAGGCAACCGCTGCTGTAGATTTAGAAACA

GATGACCTCATACAGACTACCATTAGAACAGAATTTGCAGACTGCACTATTCTAACTATAGCCCATAG
GCTCAATACAATAATGGACTATACTAGAATTATTGTGTTAGATTGCGGACAAATCAGGGAATTCGACT
CACCAACCAATTTACTATTAGATGAGAAGAGTATATTTTATGGTATGGCAAAGATGCCGGCTTGGTG
TCTTGA

Dreissena polymorpha larven ABCC

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGCGCACTGCTGCCTATGGTCATTTCTTACGTCGTCATGG
GCAACGTTTCTATTGGGCGTATCGGTTCGTTTCTGCAAAATGAAGATCTAGACCCTAACAACGTCCAA
CGCCCTGACATCTCTGATCACGCGCTCAGTATTGAGAATGGAACGTTCACTTGGTCCAAGACTGCAAA
ACCTGTCCTCAACGATATCAACCTCGAGATACCCGACGGCAAGCTCGTGGCGGTGGTTCGGTCAGGTCG
GCGCCGGCAAGTCCTCGCTCATCTCTGCCTTCTTGGGAGAGATGGAAAAACGGGCTGGCCGCGTCGTT
GTGAAGGGCCGGGTGGCGTACGTTCCGCAGCAGGCCTGGATACAGAACGCMASCRKTCGGKATCAATM
KCMKAGTWYGCGRAGGAAGTGGATCAGAACAAGTATCAGCAAGTGATCGAGGCATGCGCATTGGAACC
GGATCTGTGGTATCAACGCAGAGTACATGGGGCGATTTAACTGAGATTGGAGAAAAGGGTATCAACCT
GTCCGGTGGGCAGAAGCAGCGAGTAAGTCTGGCCAGGGCGGTGTACAACAACGCCGACGTGTATCTGT
TGGACGACCCGCTCAGTGCAGTCGATTTCGCATGTTCGGCAAACACATCTTCAACAAGGTGGTAGGACCA
AAGGGTCTTCTTAGAAAACAAGAGCGCATACTGGTYACTCACGGCGTTCACTGGCTGCCCTTGTGGAC
ACCATAGTRGTGATAATCGACGGAAAGATATCCGAGCAGGGTTCATACGAGACGCTTGTGTACGCGA
CGGTGCCCTTTCGCGAGTTCCTCAAGCAGTATCTCACACAGGAGAACGACGAGGACGAGGAGGATCCTG
AAGTTCAGCGAATTAAAAGCAAGATCTTGGAGCGTATTGATTTCGGTGACATCTGGAACCGATGCTACG
GGAAAATCGGAAGACGACGAAGTCGTAACAGCTCTGAGAAATAGAATAAAATCGCCTGCAAAGCCGCC
GCTGGCAAGATCTATATCGTCGATTGAAACGGTAACCGGTAAGGGACAGTGGAAAGATGCCAAGGACC
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTTGATACACTGCTTGCCCTATAGTGAGTCGTATTAG

Anhang 2

Verwendete Nukleotidsequenz-Zugangsnummern für NCBI

Tabelle 40: Zugangsnummern für die NCBI-Datenbank

Organismus	Gen	Zugangsnummer
<i>Mytilus californianus</i>	ABCB	EF521414.1
<i>Dreissena polymorpha</i>	MXR	AJ506742.1
<i>Homo sapiens</i>	ABCB1	NM_000927.3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCB1	NM_129247.2
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	ABCB1	NM_001033950.1
<i>Mytilus californianus</i>	ABCC	EF521415.1
<i>Homo sapiens</i>	ABCC1	NM_019898.2

Anhang 3

Nichtveröffentlichte cDNA-Sequenzen

Mytilus edulis ABCB von Mirko Pietsch

ATGAGTGAAAGCGAAGAGAGAGAAAACCTCTCCTGGCTGACGCAAGTGACGA
GCAGGAATCATACACAGACGACAAAAAGACAAAGGACGAAGAAAAGAAAA
AACCAGAAGGACCACCCCCAGCCACTCTTGGACAATTGTTCCGCTATGCC
ACAAGTGTGGACACAATCTGTATCCTGTTTGGTTCCCTGTTTTTCATTGGC
CCATGGAGCAGGATGGCCAGTATTGTCCATTGTTATGGGACAGATGACAG
ACACTTTTGTAGCAGGACCAAATGGATCCTTGATACCTGAAGGCCCAAAT
GCCACATTCAATCCCAATGCTACCACAGAATCTTTTGAAGATAAGATGAC
GACATATGCTATATATTACTTAATCATTGGTGGAGCAGTACTCTTCTCTG
GTTATTTACAGATAGCATGTTTTATGACAGCCTGTGAGAGACAAGTAAAC
AAGATAAGAAAACATTTTTTCCGAGCCATATTACGACAAGAGATTGGCTG
GTTTGATAAACATCAGAGTGGTGAACCTGACAACCTAGATTATCTGATGATT
TAGAAAGAGTGAGAGAAGGAATTGGAGACAAGCTAAGTCTTCTGATACAG
TTTACAGCTCAGTTTTTTGCTGGATTGGCATTGGATTTTGGAAAAGTTG
GAAGATGACTTTAGTTATGATGTCCTTGACACCTGTACTGGCAATTCTGG
CTGCTTATTTCTCATCACTGATGCAAAAATTTTGCCAAAAGAGAACAAGCC
TTATATGCTGATGCTGGCAGTGTAGCAGAAGAAGTAATATCTTGTATGAG
AACTGTTGTATCATTTAATGGTCAAAAACAGGAAGTTAAAAGATATGGAA
AATCTTTGGAAGAAACAAAACAAATAGGAATAAAGAAATCCATGGTAACT
GGTTTGCTGCTTGGTAGTTTATATCTTGTGATGTTTGGAGATTATGCACT
GTCATTTTGGTATGGGAATGAACAAGTTAAAGAATATATTACATCTATGG
GAGCAGAGGGAATCACACCTGGTACAGTGCTTACAGTATTTTTCTGTGTA
ATGATTGGCAGTTTCTCAATAGGAAATGCAGCACCAAACATTGGTTCCTT
TGTTACAGCCAAAGGGGCTGCAGCTGTTGTGTATGAGATCATTGACAGAG
AACCCAAAATAGATGCCAGTTCTGAGAAAGGACAACGCCCACTCTCAATA
CAAGGAGCATTAAAGTTTTAGGTGTTAATTTTACTTATCCTACTAGAGAG
GATGTCAAGTCCTGACTAATTTTAAACTGTCTATAAAACCAGGACAGACT
GTAGCATTGGTAGGATCGAGTGGATGTGGAAAATCTACCATAGTCAATCT
CATACAGAGATTCTATGACCCAGATGCAGGACAGGTTTTTACTAGATGGTA
ACAATATAAAAGATTTAAATTTGAACTGGTTACGACAGAACATTGGTGTG
GTATCACAGGAACCAGTCTTGTTTGGTTGCACCATTGCTGAGAACATCCG
ACTTGGGAATCCTAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAGGCAGCTAAAC
AAGCCAATGCACATGACTTCATAAAAAGTCTACCTCAGAGTTACAACACAC
TAGTTGGAGAGCGAGGAGCTCAGTTATCAGGAGGGCAGAAACAAAAGAGTA
GCCATTGCCAGGGCTTTGATCAGAGACCCAAGAATCCTATTGCTGGATGA
AGCTACATCTGCATTAGACTCTGAGAGTGAGAATATTGTACAGGAAGCTC
TAGAAAAGGCAAGACAGGGAAGAACAACCTTAGTGATAGCACATCGTCTG
TCCACCATAAGAAAGCAGACATTATATATGTGGTGGATAAAGGAGAGAT
TATAGAACAAGGAACCTCATGGTGACTTGATGGATAAACAAGGACTGTATC
ATTCCTTAGTCACAGCTCAGACATTGGTTAATGAAGATGCAGTTGAGTTC
GCACTAGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGCTGTAGATGCTGTCCCAGATCA
AACAGTCAAAAGACCCAGATCCAGAATCAAATCAACATCATCAGACGACA
AATCACCACAAAAATTGTCTCGTCAGATGTCTCGACAACTCTCCCGTCAG
ATGTCAGGACAGCCTGMTGGAAAAGATAAAGCTGACAAAGAAGAGGAGCC
TGAGGAGCAAGAAGAATATGAACCACCAAATACTTCCGTATGATCCATG
AAAATCAACCAGAATGTGGATTTATTGTGCTTGGGATTATGGCATCATGT
GTTGCTGGATGTACCATGCCAGCATTTGCTATATTCTTTGGAGAAATGAT
TAAGGTATTTATAGAGCTAGGAAATAATGGACTTTTATGGAGCATGATGT
TTTTGGCTCTCGGAGGAATAAATTTTCTTGCTATTTTGTACAGGCTTCT
AGTTTTGGTATATCTGGTGAGAAATTGACTCAGCGACTCAGACTCGGTAC

ATTTAATGCATATATGAGACAAGATATAGCTTTCTTTGATGACAAGTTCC
ACTCCACGGGTGCATTAACAAGTAGGCTAGCTACAGACGCATCCTTAGTA
AAAACAGCAACAGGTGTGAGAATTGGTATGGTTTTCCAGTCGTTGTTTGG
ACTGGTAGCAGCCCTTGTTCATAGCCTTCTATTATGGGTGGGCTCTAGCTC
TTGTTGTACTAGGCATTGTACCAGTAATTGGATTTGCAAGTAGTCTACAG
ATAAAAGTTTTAAAGGGAAGACATGAGGAAGATAAAAGGCAACTAGAGGA
TGCTGGGAAGACAGCTGCAGAACTATTGAAAATATCAGAACTGTCCAGT
CCTTGACCACAGAGAAACATTTTTATCATGAATATTCACATGCTCTTGTT
GGACCACTCAGATCCATGATAAAGCAAGCCCACTGGTACGGAATAGCATT
TGGTTTAGGACAAGGTGTGATTTTTATGACCTATGCTGGTGCCTTCAGAT
TTGGTGCATGGCAAGTGGAAATAGGAGAAATGACTGCTGATAATGTGTTT
AAGGTGTTCTTTGCCATAGCCTTCACTGCCATGGTGATTGGACAATCGTC
ATCATTTCTGCCAGAGTATGCAAAGGCCAAACATGCTGCTGGATTGATTT
TCAAAGCATTTGATACTATAACCGCTATAGATATATATTCCAAAAGAGGA
ACTTATCTGCAAAAAGTGGATGGTTTGATACAGTTTAAAGAGGTCAGTTT
CTGTTACCCAACTAGACCTGAGGTAAAGGTCTTGAAAGGAGTGAATATGA
AGGTGGAACCAGGGCAGACTGTGGCTCTTGTTGGGACAAAGTGGGTGTGGC
AAATCTACAGTTATCTCCCTTTTGACAGAGATTCTATGATCCTGAGTCAGG
GGAAATTATGATAGATGGTATAGATATAAAAGACCTACATCTTCACAAAA
TGAGGTCATTTATTAGTGTGGTCAGTCAGGAACCGATCCTGTTTAATTGT
AGTATCCGTGACAACATAGCTTATGGTCTGGAGGAACTGCAGGGATGGA
TGATATTATTACAGCCGCTAGAGATGCAAATATACACGAGTTTATTACTA
GTCAACCTATGGGTTATGACACAGTAGTTGGTGAGAAGGGGACACAGCTG
TCTGGTGGACAGAAGCAGCGAGTTGCCATAGCAAGAGCTTTGATTAGAAA
TCCCAAAATTCTCTTATTAGACGAGGCTACATCGGCATTAGATTAGAGA
GTGAGAAGTTGGTACAAGAAGCATTAGACAAAGCACAGAAGGAAGAACA
TGTATTGTGATAGCCCATCGTCTTTCCACAATTCAAATGCTGATGTGAT
CTTTGTAATGGACAATGGAACCATGTAGAAAGTGGCACACACCAGACAT
TATTGGCTAAAAAAGGGGTGTACAATTCTTTAGTTAGTGCCAGCAGTTT
ATAAAATAG

Mytilus galloprovincialis ABCB von Mirko Pietsch

ATGAGTAAAAGCGAAGAGAGAAAGCCTCTCCTGGCTGACGCAAGTGACGA
GCAGGAATCATACACAGACGACAAAAAGACAAAGGACGAAGAAAAGAAAA
AACCAGAAGGACCACCCCCAGCCACTCTTGACAATTGTTCCGCTATGCC
ACAAGTGTGGACACAATCTGTATCCTGTTTGGTTCCCTGTTTTTCATTGGC
CCATGGAGCAGGATGGCCAGTATTGTCCATTGTTATGGGACAGATGACAG
ACACTTTTGTAGCAGGACCAAATGGATCCTTGATACCTCCAGACCCAAAT
GCCACATTCAATCCCAATGCTACTGCACAGTCTTTTGAAGATAAGATGAC
GACATATGCTATATATTACTTAATCATTGGTGGAGCAGTACTCTTCTCTG
GTTATTTACAGATAGCATGTTTTATGACAGCCTGTGAGAGACAAGTAAAC
AAGATAAGAAAACATTTTTTCCGAGCCATATTACGACAAGAGATTGGCTG
GTTTGATAAACATCAGAGTGGTGAAGTGAACAAGTAACTAGATTATCTGATGATT
TAGAAAAGAGTGAGAGAAGGAATTGGAGACAAGCTAAGTCTTCTGATACAG
TTTACAGCTCAGTTTTTTGCTGGATTTGCCATTGGATTTTGGAAAAGTTG
GAAGATGACTTTAGTTATGATGTCTTGACACCTGTACTGGCAATTCTTG
CTGCTTATTTCTCATCACTGATGCAAAATTTTGCCAAAAGAGAACAAGCC
TTATATGCTGATGCTGGCAGTGTAGCAGAAGAAGTAATATCTTGTATGAG
AACTGTTGTATCATTTAATGGTCAAAAACAGGAAGTTAAAAGATATGGAA
AATCTTTGGAAGAAACAAAACAAATAGGAATAAAGAAATCCATGGTAACT
GGTTTGCTGCTTGGTAGTTTATATCTTGTGATGTTTGGAGATTATGCACT
GTCATTTTGGTATGGAAATGAACAAGTTAAGGAATATATTACATCTATGG
GAGCAGAGGGAATCACACCTGGTACAGTGCTTACAGTATTTTTCTGTGTA
ATGATTGGCAGTTTCTCAATAGGAAATGCAGCACCAACATTGGTTCCTT
TGTTACAGCCAAAGGGGCTGCAGCTGTTGTGTATGAGATCATTGACAGAG
AACCCAAAATAGATGCCAGTTCTGAGAAAGGACAACGCCCACTCTCAATA
CAAGGAGCATTAGAGTTTTTAGGTGTTAATTTTACTTATCCTACTAGAGA
GGATGTTCAAGTCTGACTAATTTTAACTGTCTATAAAACCAGGACAGA
CTGTAGCATTGGTAGGATCGAGTGGATGTGGAAAATCTACCATAGTCAAT
CTCATAACAGAGATTCTATGACCCAGATGCAGGACAGGTTTTTACTAGATGG
TAACAATATAAAAGATTTAAATTTGAACTGGTTACGACAGAACATTGGTG
TGGTATCACAGGAACCAAGTCTTGTTTGGTTGCACCATTGCTGAGAACATC
CGACTTGGGAATCCTAATGCAACCATTACAGAAATAGAACAGGCAGCTAA
ACAAGCCAATGCACATGACTTCATAAAAAGTCTACCTCAGAGTTACAACA
CACTAGTTGGAGAGCGAGGAGCTCAGTTATCAGGAGGGCAGAAACAAAGA
GTAGCCATTGCCAGGGCTTTGATCAGAGACCCAAGAATCCTATTGCTGGA
TGAAGCTACATCTGCATTAGACTCTGAGAGTGAGAATATTGTACAGGAAG
CTCTAGAAAAGGCAAGACAGGGAAGAACGACCTTAGTGATAGCACATCGT
CTGTCCACCATGCAGAAAGCAGACATTATATATGTGGTGGATAAAGGAGA
GATTATAGAACAAGGAACATCATGGTGAAGTGTGATGGATAAACAAGGACTGT
ATCATTCCCTAGTCACAGCTCAGACATTGGTTAATGAAGATGCAGTTGAG
TTCGCACTAGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAAGCTGTAGATGCTGTCCCAGA
TCAAACAGTCAAAAGACCCAGATCCAGAATCAAATCTACATCATCAGATG
ACAAATCACCACAAAAATTTGTCTCGTCAGATGTCTCGACAACTCTCCCGT
CAGATGTCAGGACAGCCTGATGGAAAAGATAAAGCTGACAAAGAAGAGGA
GCCTGAGGAGCAAGAAGAATATGAACCACCAAAATACTTCCGTATGATCC
ATGAAAATCAACCAGAATGTGGATTTATTGTGCTTGGGATTATGGCATCA
TGTGTTGCTGGATGTACCATGCCAGCATTGCTATATTCTTTGGAGAAAT
GATTAAGGTATTTATAGAGCTAGGAAATAATGGACTTTTATGGAGCATGA
TGTTTTTTGGCTCTCGGAGGAATAAATTTTCTTGTCTATTTTGTACAGGCT
TCTAGTTTTGGTATATCTGGTGAGAAATTGACTCAGCGACTCAGACTCGG
TACATTTAATGCATATATGAGACAAGATATAGCTTTCTTTGATGACAAGT
TCCACTCCACGGGTGCATTAACAACCTAGGCTAGCTACAGACGCATCCTTA
GTAAAAACAGCAACAGGTGTGAGAATTGGTATGGTTTTCCAGTCGTTGTT
TGGACTGGTAGCAGCCCTTGTCTAGCCTTCTATTATGGGTGGGCTCTAG
CTCTTGTGTACTTTGGCATTGTACCAATAATTGGATTTGCAAGTAGTCTA

CAGATAAAAGTTTTAAAGGGAAGACATGAGGAAGATAAAGGCAAACTAGA
GGATGCTGGGAAGACAGCTGCTGAAACTATTGAAAATATCAGAACTGTCC
AGTCCTTGACCACAGAGACACATTTTTATCACGAATACTCACATGCTCTT
GTTGGACCACTCAGATCCATGATAAAGCAAGCCCACTGGTACGGAATAGC
ATTTGGTTTAGGACAAGGTGTGATTTTTATGACCTATGCTGGTGCCTTCA
GATTTGGTGCATGGCAAGTGGAAATAGGAGAAATGACTGCTGATAATGTG
TTCAAGGTGTTCTTTGCCATAGCCTTCACTGCCATGGTGATTGGACAATC
GTCATCATTTCTGCCAGAGTATGCAAAGGCCAAACATGCTGCTGGATTGA
TTTTCAAAGCATTTGATACTATAACCGCCTATAGATATATATTCCAAAAGA
GGAAGTTATCTGCAAAAAGTGGATGGTTTGATACAGTTTAAAGAGGTCAG
TTTCTGTTACCCAACTAGACCTGAGGTAAAGGTCTTGAAAGGAGTGAATA
TGAAGGTGGAACCAGGGCAGACTGTGGCTCTTGTGGGACAAAGTGGGTGT
GGCAAATCTACAGTTATCTCCCTTTTGCAAGAGATTCTATGATCCTGAGTC
AGGGGAAATTATGATAGATGGTATAGATATAAAAGACCTACATCTTCACA
AAATGAGGTCATTTATTAGTGTGGTCAGTCAGGAACCGATCCTGTTTAAT
TGTAAGTATCCGTGACAACATAGCTTATGGTCTGGAGGAAACTGCAGGGAT
GGATGATATTATTACAGCCGCTAGAGATGCAAATATACACGAGTTTATTA
CTAGTCAACCTATGGGTATGACACAGTAGTTGGTGAGAAGGGGACACAG
CTGTCTGGTGGACAGAAGCAGCGAGTTGCCATAGCAAGAGCTTTGATTAG
AAATCCCAAAATTCTCTTATTAGACGAGGCTACATCGGCATTAGATTAG
AGAGTGAGAAGTTGGTACAAGAAGCATTAGACAAAGCACAAGAAGGAAGA
ACATGTATTGTGATAGCCCATCGTCTTTCCACAATTCAAATGCTGATGT
GATCTTTGTAATGGACAATGGAACCATYGTAGAAAGTGGCACACACCAGA
CATTATTGGCTAAAAAAGGGGTGTACAATTCTTTAGTTAGTGCCCAGCAG
TTTATAAAATAG

Mytilus edulis ABCC von Mirko Pietsch

ATGGATTACAATCTTTTCGGTATGCAGTTCACAGTTAAGTTTAAATAGATTTCAGTAACATTAGAAAAGGG
 ACCATCTTTAGCAGAAATGGACACCTGTGCTGTTTGTGTTTAGGGGCACCTCTCCACTTTTTGTATTTCA
 AACGCAATTTGTTCAGCAGCTATTGTTTCAGTACAAATTCATTTTAGCAATATTCATCACACTATTAGGC
 ATACTAAGCTTATCTATTGGAATGAGAGATATTCATGACGTTTTGATTGGAAACAAGTCTCTTGATGG
 TTTTATTTTATCAATTAGTATAGTGTTGACAACGATATTGATACAAGATGAATCTCATAAAACACAGA
 CGAAGAAAAAGAGAAATTACAGATTTTTCCACATACTTGGTCTTTTCTGTAGTTTTGGAATTCGTTT
 GTTTTTATTTTTCAAAAACGAAAGGATACTGCTGTTGATTTTCAGAATAACTGGGAATTACAACCTAAC
 AGAGTGGACAACAAAACCTATATTGTGTGTTGATAAGTGTGTACCTGTTAGAATCAGTAATACTGGTTT
 TAAACACAGTTCTGGGAGCGAACCAGTCTTTTGAAAAGGGTAAAGCAGACAAAGACGTTTCCCCAGAA
 ATTAAAGCATCTTTTTTGTTCACGGCTCACCTGGAGTTGGGTAACGCCATTTGTACTGTTTGGATACAA
 GCATAATCTCGAACCGTCAGATTTATGGCCCTTAAACCTGAACATTTATCTACAAATATCATTCCTA
 TTTTCGATAAGTACTGGGAAGAGGAGGTAGAGAAAAGCTACAAGAGAGAGACAATCCCAAGAAAAGCGA
 ACGATTAAGACAACAACAATTACTGTTGAGAAAAAGTTTCAGGCAAACCTCCTTCGTTGTGTTATAAG
 AGCATTGGGGCCTGCTTTGTTGCTGTCAGCTTTTTACAAATTATTGTATCATTTAGCCGAGTTCACCT
 TTCCCTATATGATAAGACTCCTAATTGGCATAGCAAGAGATGGAAAAGAAGAGATCTGGAAAGGTTAC
 ATACTTGCTATCCTTATGTTTTCTGTCTCAATATTTAAATCAGTTGTTTTGAATATTCATATTAATGA
 AACACAAGAAGCAGGAAGGAGTAACTGGGTAGCTCTTACTGCTGCCATTTATAAAAAGACTCTGAGAC
 TCACTAATGCAGCTAAGCAAGATTCTACTGTAGGCGAGATCATCAACTTGATGTCTGTTGATGCTGAA
 AAGATAGGAAATTGTATGTGGAGTGTGAATGAAGTATGGGCGGTTCTCTGTTATTTTCAATATCTTT
 TTACTTCCCGTGGCAAACCTTAGGACCCTCAGTCTTGGTTGGGCTTATAATTATACTATTATTGGTAC
 CAGTTAATTTTGTGTTGATGAGGAAATCAAAACATTTGCAATTGGAGAGCATGAATTTAAAAGACGCA
 AGAATAAAAAAGATGAATGAAGTCTTAAATGGAATTAAGTTTTAAAGATGTATGCATGGGGGGAATG
 TTTTGAGAAGCGCATTTTAGAAATTCGAGACAAAGAACTACATATACTAGCAGGACGAAAAGGAATTC
 AAAATTGGATGCATGTGATATGGGCAACGACGCCTTTTATGATATCTTTGTGTACCTTCGGAGCGTAC
 GTGTTAATGGATGCCAATAATGTCATGTCAGCAGAAAAGGTGTTTGTATCTCTATCACTGTTCAATAT
 ACTTCAATATTCACTACATCTTTTACCACACGTCATCAACTATTTTATCCAGACAGCTGTTTCTTTAA
 AAAGAATACAAAACCTTCTGAACAACGAAGAGCTGGATACAAGTATTATAACAAGAAATACTGATTCA
 GAATATGGAATAACAGTTGAAGATGGAACATTTATTTGGGATACAACCATGGAACCAACTTTGAAAGA
 CATTACATTCAAATACCACAAGGATCACTTGTTGCAATAGTGGGTTCCGTTGGAGCAGGGAAGTCCC
 CGTTGTTGTCAGCCATACTTGGAGAAATGGAATCACAAACAGCGAAGGTAAATATTAAGGGTTCGATT
 GCATATGTTGCTCAACAGCCATGGATAATGAATACAAGTTTACAACAAAACATTTCTTTTCGGAGAAGA
 CCTGGACAAGAAGAAGTACGAATTCATTGTAGATGCATCAGCTCTTAGAAAAGACTTGGAAGTGTAC
 CTGGAGGGGACCAAACAGAAATTGGCGAAAAGGGCATTAAATTTAAGTGGCGGACAAAAGCAGAGAGTC
 AGTTTGGCCCGTGCTGTGTATCAGAATGCTGACATATATTTACTAGACGATTCTTTAAGTGCTGTTGA
 CGCACATGTTGGCAAACACATTTTTGATGAAATCATAGGCTCAAATGGGCTTTTAAAAGAAAAGACAA
 GAATACTTGTTACGCATGGCCTAAATTACATACGGAAAGTCGACATCATCATAACAATGGTAGATGGC
 CGAATCGGAGAAATAGGATCATTTGATGAACTCACTGAACACGATGGACCTTTTGCAGTATTCATGAA
 AAATTATTTGGCGGAAGAAGTACTGATGATGAACAAAACATAGTTTCGTCCAGAACATTAGAAG
 GAAAATCAACAACCTGACGAGACAATTATCCATAGTACACACTCAGATATTGTACACAGTATAAGTGAT
 AATTCAAATATACCAATAGCCAGACAGATGTACGACAGATGTACGACAGATGTACGACAGACGTC
 ATGTGAGAGCGAGTCGTCCGAAGTTTTGTCACATAATACATTGGTACAGGAGGAGAATGGAGAGTCAG
 GATCGGTAAAATTAAGCGTGATTATGACCTATGCAAGAGCTGTTGGCTTTAAGACTGTAATAGTAATA
 TTAACAATGAGTATGGTTCATGAACTTGCGGAGATGTATTTAGATGTATGGCTTAGTAAATGGACACA
 AGACCATACAAACGGAACAGCTAATGAACTCAAAGAAACAGGAGACTTGGAATTTATGGAGCTATAG
 GACTTTTTAGAGGTGTGTCAATCTTTATTACGGAAACCTTTGTTACTTATGGACTGATAAAGGCAACT
 AGAAAACCTCATAAAGATTTGTTACGTAACATTTTGAGATCACCAATGAGTTTTTTCGATACCACACC
 GGTAGGCAGGATTGTAATCGGTTCTCGAAGGATATAGAAACCATAGACGACGAACCTGATCTACCAGT

TTAAAGACGTGGTCATATGTCTGTTATTAGTTTTGTGTAATACAGTCATCATTAGCACTGGGACACCT
CAGTTCTTATTTATAATGCTTCCAGTAACGGTTGTGTATTTGCGCTTACAGCGCTTGACGTCTCAAC
ATCTCGACAATTAAGGACGATGGCATCAGCAGCTCGATCCCCTATATTTTCACACTTTGGGGAAACCA
TTTCTGGATGTTTCGACAATCCGGGCCTTTCAACAGGAGAAAAGATTTATGACTGAATCAGCACGTCTGA
TTTGATGAACTCAACACACGTCGTTCTCTTGACGATCAGTTGAAAAGTGGTTACATATCCGACTAGA
CTGGTTAGGAAGCATTATAGTATTGTGTGTTTGCCTGCTAGTTGTAGTAAATAAGGACGATATCTCAC
CAGGGATAGTTGGTTTGGCTATTACGTACGCTTTGAATGTGACTAATTGCATTGAATGGTTGGTAAAG
TTAACTACGAATGCAGAAACGAATATTATATCTCTAGAGAGAATTAAAGAATACTCAGAAACACATAC
AGAGGCTGATTGGATAGTGGAAAATAAAAGACCAGAAAATGATTGGCCAAACGAAGGAAATGTTGAAA
TGGACAATTATGGTGTTCGCTATAGGGAAGGTCTTGAATTAGTTTTGAAAAGCATCTCATGTAAAATA
GCTCCATGTGAAAAGATTGGTATTGTTGGTCTGAACAGGAGCTGGGAAGTCCTCATTAAACCATGGGCCT
GTTTCAAGATTATAGAAAAAGCTCAAGGACGGATTCTTATAGATGGGATCGACATTTCTACGATAGGAC
TTCATGATCTGAGATCAAAGATTACTATTATACCACAGGATCCAGTCTTGTTTTCTGGAACAATGAGA
ATGAACTTGGATCCGTTTGATGAATACTCTAACGAAGACATTTGGACGGCCCTCAACCATGCACATCT
GAAAGCCTTTGTGATTGGTTTAAAAGACGGACTGGATCACCATTGTTCTGAAGGAGGAGATAACCTAA
GTGTTGGTCAACGACAATTAATCTGTCTTGCAAGAGCCTTACTGAGAAGGACTAAAATTTTAGTACTT
GATGAGGCAACCGCTGCTGTTGATTGGAACAGATGACCTTATACAGACCACCATTAGAACAGAATT
TGCAGACTGCACTATACTAACTATAGCTCACAGACTCGATACAATAATGGACTATACTAGAATTATGG
TGTTAGATTGTGGACAAATCAGGGAATTCGACTCACCAACCAATTTACTATTAGATAAGAAGAGTATA
TTTTATGGTATGTCAAAAAGATGCCGGCTTGGTGTCTTGATGATAATGGTGTAAAGTCTTTGATAAAT
AGGATTTTATGT

Mytilus galloprovincialis ABCC von Mirko Pietsch

ATGGATTACAATCTTTTCGGTATGCAGTTCACAGTTAAGTTTAAATAGATTTCAGTAACAATAGAAAAGGG
ACCATCTTTAGCAGAATGGACACCTGTGCTGTTTGTGTTTAGGGGCACCTCTCCACTTTTTGTATTTCA
AACGCAATTTGTCTAGTAGCTATTGTTTCAGTACAAATTCATTTTAGCAATATTCATCACACTATTAAGC
ATACTAAGCTTATCCTATGGACTGAGAGATATTCATGACGTTTTGATTGGAGAAAAGTCTCCTGATGG
TTTTATTTTATCAATTAGTATAGTGTTGACAACGATATTGATACAAGATGAATCTCATAAAACACAGA
GGAAGAAAAAGAGAAAAATACAGATTTTTCCACATATTTGGTCTTTTCTGCAGTTTTGGAATTCGTTT
GTTTCTATTTTTCAAAAACGAAAGGATGTTGATTTTCAGAATAACTGGGAATTACAATAACAGAGTG
GACAACAAAACCTATATTGTGTGTTGATAAGTGTGTACCTGATAGAATCAGTAATACTGGTTTTAAAC
AGGTTCTTGGAGCGAACCAGTCTTTTGAAAAGGATAAAGCAGACAAAGACGTTTCCCCAGAAATTAAA
GCATCTTTTTTGTACGGCTCACATGGAGTTGGGTAACGCCATTTGTACTATTTGGATACAGGCATAA
TCTCGAACCCTCAGATTTATGGCCCTTAAACCTGAACATTTATCTACAAATATCATTCTCTATTTTCG
ATAAGTACTGGGAAGAGGAGGTAGAGAAAAGCTACAAGAGAGAGACAATCCCAAGAAAAGCGAACGATT
AAGACAACAACAATTACTGTTGAGAAAAAAGTTTCAGGCAAACCTCCTTCGTTGTGTTATAAGAGCATC
GGGGCCTGCTTTGTTGCTGTACGCTTTTTACAAATTATTGTATCATTAGCCGAGTTCACCTTTCCCT
ATATGATAAGACTCCTAATTGGCATAGCAAGAGATGGAAAAGAAGAGATCTGGAAAGGTTACATACTT
GCTATCCTTATGTTTTCTGTCTCAATATTTAAATCAGTTGTTTTGAATATTCATATTAATGAAACACA
AGAAGCAGGAAGGAGTAACCTGGGTAGCTCTTACTGGTGCCATTTATAAAAAGACTCTGAGACTTACTA
ATGCAGCTAAGCAAGATTCTACTGTAGGCGAGATCATCAACTTGATGTCTGTTGATGCTGAAAAGATA
GGAAATTGTATGTGGAGTGTGAATGATGTATGGGCCGTTCTCTGTTATTTTTCAATATCTTTTTACTT
CCTGTGGCAAACCTTAGGACCCTCAGTCTTGGTTGGGCTTATAATTATACTATTATTGGTACCAGTTA
ATTTTGTGTTGATGAAGAAATCAAAACATTTGCAATTGGAGAGCATGAATTTAAAAGACGCAAGAATA
AAAAAGATGAATGAAGTCTTAAATGGAATTAAGGTTTTAAAGATGTATGCATGGGAGGAATGTTTTGA
GAAGCGCATTTTAGAAATTCGAGACAAAGAACTACATATACTAGCAGGACGAAAAGGAATTCAAAATT
GGATGCATGTGATATGGGCAACGACGCCTTTTATGATATCTTTGTGTACCTTCGGAGCGTACGTGTTA
ATGGATGCCAATAATGTCATGTACAGCAGAAAAGGTGTTTGTATCTCTATCACTGTTCAATATACTTCA
ATATTCACTACATCTTTTACCACACGTCATCAACTATTTTATCCAGACAGCTGTTTCTTTAAAAAGAA
TACAAAACCTTTCTGAACAACGAAGAGCTGGATACAAGTATTATAACAAGAAATACTGATTTCAGAATAT
GGAATAACAGTTGAAGACGGAACATTTATTTGGGATACAACCATGGAACCAACTTTGAAAGACATTAC
ATTCAAAATACCACAAGGATCACTTGTAGCAATAGTGTGTTCCGTGGGAGCGGGGAAGTCCTCGTTGT
TGTCAGCCATACTTGGAGAAATGGAATCAGAAACAGCGAAAGTTAATATTAAGGTTTCGATTGCATAT
GTTGCTCAACAGCCATGGATAATGAATACAAGTTTACAACAAAACATTCTTTTCGGAGAAGACCTGGA
CAAGAAGAAGTACGAATTCATTGTAGATGCATCAGCTCTTAGAAAAGACTTAGAAGTATTACCTGGAG
GGGACCAAACAGAAATTGGCGAAAAGGGCATAAAATTTAAGTGGTGGACAAAAGCAGAGAGTCAGTTTG
GCCCCGTGCTGTGTATCAGAATGCTGACATATATTTACTGGACGATTCTTTAAGTGTGTTGACGCACA
TGTTGGCAAACACATTTTTGATGAAATCATAGGCTTAAATGGGCTTTTAAAAGAAAAGACAAGAATAC
TTGTTACGCATGGTCTAAATTACATACGGAAAGTCGACATCATCATAACAATGGCAGATGGCCGAATC
GGAGAAATAGGATCATATGATGAACTCACTGAACACGATGGACCTTTTGCAGGATTCATGAAAAATTA
TTTGGCGGAAGAACTGAGTACTGATGATGAACAAAACATAGTTTCGTACAGAAAATTAGAAGGAAAAT
CAACCACTGACGAGACAATTATCCATAGTACACATTCAGATATTGTACACAGTATAAGTGATAATTCA
AATATAACCGATAGCCAGACAGATGTCACGACAGACGTCATGTGAGAGCGAGTCATCGGAAGTTTTATC
ACATAATACATTAGTACAGGAGGAGAATACAGAGCCAGGATCGGTAAAATTAAACGTGATTATGACCT
ATGTAAGAGCTGTTGGCGTTAAGATTGTAATAGTTATATTAACAATGAGTATGGTTCATGAASTTGCS
GAGATGTATTTAGATGTGTGGCTTAGTAAATGGACACAAGATCATACAAACCGAACAGTTAATGGAAC
TCAAAGAAACAGGAGACTTGGAATTTATGGAGCTATAGGACTTTTLAGAGGTGTGTCAATCTTTATTA
CGGAAACCTTTGTTACTTATGGACTGATAAAGGCAACTAGAAAACCTCATAAAAGATTTGTTACGTAAC
ATTCTGAGATCACCAATGAGTTTTTTCGATACCACACCGGTAGGCAGGATTGTAAATCGGTTCTCGAA
GGATATAGAAACCATAGACGACGAACTGATCTACCAATTTAAAGACGTGGTCATATGTCTGTTATTAG

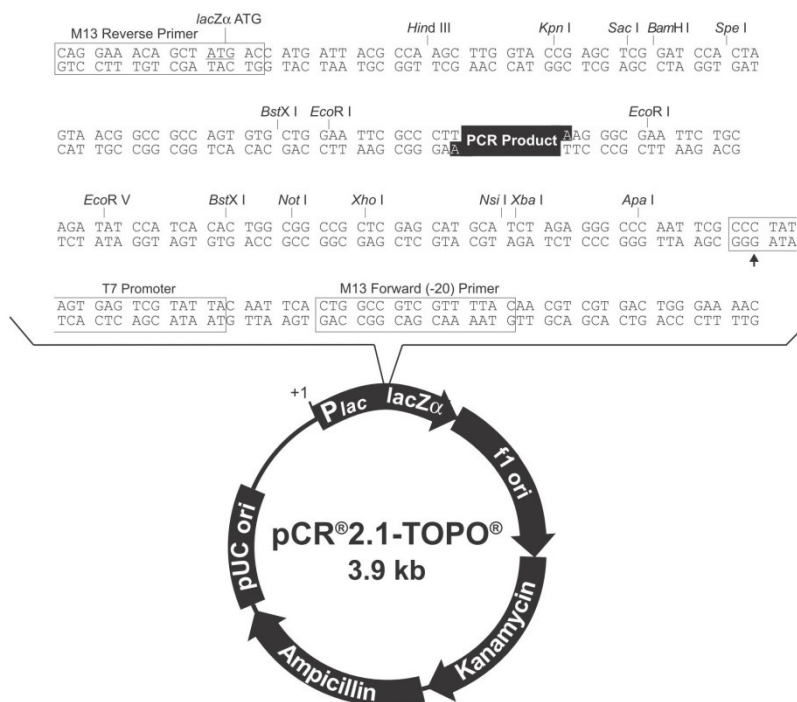
TTTTGTGTAATACAGTCATCATTAGCACTGGAACACCTCAGTTTTTTATTTATAATGCTTCCAGTCACG
GTTGTGTATTTTCGCCTTACAGCGCTTGTACGTTTCAACATCTCGACAATTAAGGACGATGGCATCAGC
AGCTCGATCCCCCTATATTTTACACACTTTGGGGAAACCATTTCTGGATGTTTCGACAATCCGGGCCTTTC
AACAGGAGAAAAGATTTATGACTGAATCAGCACGTCGATTTGATGAACTCAACACACGTCGTTCTCTT
GCACGATCAGTTGAAAAGTGGTTACATATCCGACTAGACTGGTTAGGAAGCATTATAGTATTGTGTGT
TTGCATGCTAGTTGTAGTAAATAAGGACGATATCTCACCAGGGATAGTTGGTTTGGCTATTACGTACG
CTTTGAATGTGACTAATTGCATCGAATGGTTGGTAAAGTTAACTACGAATGCAGAAACGAATATTATT
TCTCTAGAGAGAATCAAAGAATACTCAGAAACACATACAGAGGCTGATTGGATAGTGAAAAATAAAAG
ACCAGAAAATGATTGGCCAAATGAAGGAAACGTTTCAGTTTGATAATTATGGTGTTTCGCTATAGGGAAG
GTCTTGAATTAGTTTTTGAAGCATATCATGTAAAAATAGCTCCATGTGAAAAGATTGGTATTGTTGGT
CGAACAGGAGCTGGGAAGTCGTCATTAACCATGGGCCTGTTTCAGAATTATAGAAAAAGCTCAAGGACG
GATTCTTATAGATGGTATCGACATTTCTACGATAGGACTTCATGATCTAAGATCAAAGATTACTATTA
TACCACAGGACCCAGTTTTGTTTTCTGGAACAATGAGAATGAACTTGGATCCGTTTGATGAATACTCT
AACGAAGACATTTGGACAGCTCTCAACCATGCACATCTGAAAGCCTTTGTGATTGGTTTAAAAGACGG
ACTGGATCACCATTGTTCTGAAGGAGGAGATAACCTAAGTGTTGGTCAACGACAATTAATCTGTCTYG
CAAGAGCCTTACTGAGAAAGACTAAAATTTTAGTACTTGATGAGGCAACCGCTGCTGTTGATTGGAA
ACAGATGACCTCATACAGACCACCATAAGAACAGAATTTTCAGACTGCACTATATTAAGTATAGCTCA
CAGACTCAATACAATAATGGACTATACTAGAATTATGGTGTTAGATTGTGGACAAATCAGGGAATTCG
ACTCACCATCCAATTTACTATTAGATAAGAAGAGTATATTTTATGGTATGTCAAAAGATGCCGGCTTG
GTGTCTTGATGATAATGGTGTTAAAGTCTTTGATAAATAGGATTTTATGT

Dreissena polymorpha ABCC von Anna Navaro

ACGGAAATTGGTGAAAAGGGTATCAACCTGTCCGGTGGGCAGAAAGCAGCGAGTAAGTCTGGCCAGGGC
GGTGTACAACAACGCCGACGTGTATCTGTTGGACGACCCGCTCAGTGCAGTCGATTTCGCATGTTGGCA
AACACATCTT

Anhang 4

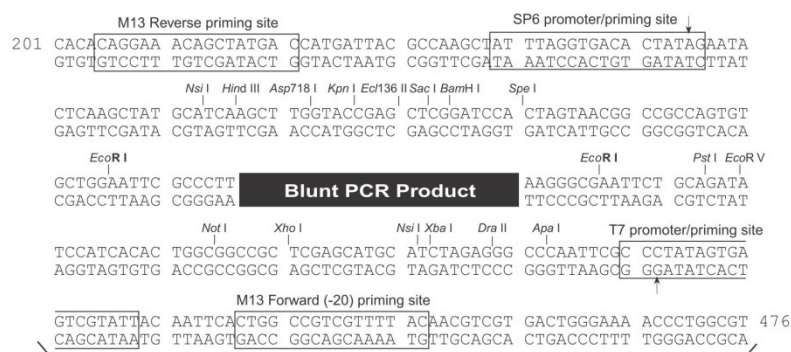
pCR®2.1-TOPO-Vektor



Comments for pCR®2.1-TOPO® 3931 nucleotides

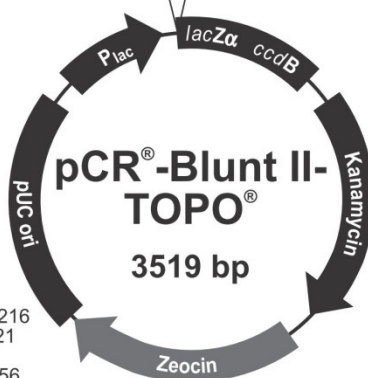
LacZ α fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

pCR®-Blunt II-TOPO Vektor



Comments for pCR®-Blunt II-TOPO® 3519 nucleotides

lac promoter/operator region: bases 95-216
 M13 Reverse priming site: bases 205-221
 LacZ-alpha ORF: bases 217-576
 SP6 promoter priming site: bases 239-256
 Multiple Cloning Site: bases 269-399
 TOPO®-Cloning site: bases 336-337
 T7 promoter priming site: bases 406-425
 M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
 Fusion joint: bases 577-585
ccdB lethal gene ORF: bases 586-888
kan gene: bases 1099-2031
kan promoter: bases 1099-1236
 Kanamycin resistance gene ORF: bases 1237-2031
 Zeocin resistance ORF: bases 2238-2612
 pUC origin: bases 2724-3397



Invitrogen™
life technologies

Anhang 5

PCR-Primer, vektorspezifische Primer, *full length* Primer, RACE-Primer

Tabelle 41: vektorspezifische und genspezifische Primer

Nr.	<i>forward</i> Primer	<i>reverse</i> Primer	Anwendung
1	ATGAGTGAAAGCGAAGAGAGAAAAC	CCTTGATTGACAGTGGGCGTTGTCC	ABCB
2	GGACAACGCCCACTGTCAATACAAGG	GTCTAATGCAGATGTAGCTTCATCCAG	ABCB
3	CTGGATGAAGCTACATCTGCATTAGAC	GCATTAAATGTACCGAGTCTGGGTGCG	ABCB
4	GCGACCCAGACTCGGTACATTTAATGC	CAATAGTTTCTGCAGCTGTCTTCCCAG	ABCB
5	CTGGGAAGACAGCTGCAGAACTATTG	GGATGATTGTCCAATCACCATGGCAG	ABCB
6	CTGCCATGGTGATTGGACAATCATCC	GACCTCATTTTGTGAAGATGTAGGTC	ABCB
7	GACCTACATCTTCACAAAATGAGGTC	CTATTTTATAAACTGCTGGGCACTAACT	ABCB
8	ATGGATTACAATCTTTCGGTATGC	GTTACCCAACTCCAGGTGAGCCGTGAC	ABCC
9	CCTGGAGTTGGGTAACGCCATTTGTAC	CAAGACTGAGGGTCTAAGGTTTGCC	ABCC
10	GGCAAACCTTAGGACCCTCAGTCTTG	CCATCTTCAACTGTTATTCCATATTCTG	ABCC
11	CAGAATATGGAATAACAGTTGAAGATGG	CTCCGATTCTGGCCATCTACCATTGTTA	ABCC
12	TAACAATGGTAGATGGCCGAATCGGAG	CATCTCCGCAAGTTCATGAACCATAC	ABCC
13	GACCTATGCAAGAGCTGTTGGC	GAGACGTACAAGCGCTGTAAGGCG	ABCC
14	CGCCTTACAGCGCTTGTACGTCTC	CTCTCTAGAGATATAATATTCGTTTCTGC	ABCC
15	GCAGAAACGAATATTATATCTCTAGAGAG	ACATAAAATCCTATTTATCAAAGACTTTAAC	ABCC
16	GTAAAACGACGGCCAG	CAGGAAACAGCTATGAC	pCR2.1 + pCR II Vektor
17	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	pJET 1.2 Vektor

Tabelle 42: *full length* Primer

Nr.	<i>full length forward</i> Primer	<i>full length reverse</i> Primer	Anwendung
18	GCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGG	CACGAGAATCACGAGAACTTGTGTG	ABCB <i>M. edulis</i>
19	GTTTCCGGTTGTAGATTTACATGTTTCC	CCTGAAAATGAGGTCAAGTGACCTTAC	ABCB <i>M. edulis</i>
20	CAGGTGGGTTCCACTTTCTACGATGGC	GCTTTGGTAGGATCCAGTGGGTGTGG	ABCB <i>M. trossulus</i>
21	CGCCTGTTTTATGACAGCCTGTGAGAG	CTGGTGTGTACCACTTTCTACGATGGC	ABCB <i>M. trossulus</i>
22	CGCGGGGGTACGCATCGCTTTTATATG	CATTGTCATCAAGACACCAAGCCGGCATC	ABCC <i>M. trossulus</i>
23	ATGGATTACAATCTTTCGGTATGC	GGTGAGTCGAATTCCTGATTGTCCGC	ABCC <i>M. trossulus</i>

Tabelle 43: RACE-Primer

Nr.	RACE Primer	<i>nested</i> RACE Primer	Anwendung
24	GCTTATCTCCGATGCCTTCTCTCACTC	CTGGTTGTGAGTTCACTACTCTGATG	ABCB <i>M. edulis</i> 5'-RACE
25	GGTCGTACGTGTATTGTGATAGCCCATC	GGACAGTGGCGCCATCGTAGAAAGTGG	ABCB <i>M. edulis</i> 3'-RACE
26	CAAGACTGGTTCCTGCGATACCACACC	GTAAAACCTGTCTGATCTGGGTGCG	ABCB <i>M. trossulus</i> 5'-RACE
27	GCAGCGTGTGCCATAGCAAGAGCC	GCACTAGACAAAGCACAAGAAGGTGCG	ABCB <i>M. trossulus</i> 3'-RACE
28	GAATTTGTACTGGACAACAGCTGCTTG	GTGAAATAGACAAAGTTGATAGGCGCTGC	ABCC <i>M. trossulus</i> 5'-RACE
29	CAATCCGGGCCTTTCAACAGGAGAAACG	CTCGGCGTTCTCTTGACGATCAGTCG	ABCC <i>M. trossulus</i> 3'-RACE
30	CGACTGCACTGAGCGGGTCGTCCAACAG	CTCGCTGCTTCTGCCACCGGACAGG	ABCC <i>D. polymorpha</i> 5'-RACE
31	CCTGTCCGGTGGGCAGAAGCAGCGAG	CTGTTGGACGACCCGCTCAGTGACGTCG	ABCC <i>D. polymorpha</i> 3'-RACE
32	GGACATCAATCTGAAGTGTTGGCGGG	GGACGAGGCCACGTCAGCACTAGACAC	ABCB <i>D. polymorpha</i> 5'-RACE
33	GTGTCTAGTGCTGACGTGGCCTCGTCC	CCCGCCACCACTTCAGATTGATGTCC	ABCB <i>D. polymorpha</i> 3'-RACE